

**Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß-und Transplantations-
chirurgie der Ludwigs-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Jens Werner**

*Stammzellen -vermittelte Nierenregeneration nach Nieren-
transplantation*

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von:

Andreas Ulrich Meyer

aus:

Nürnberg

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med. Karl-Walter Jauch

Mitberichterstatter: PD Stephan Lederer
PD Antje Habicht
Prof. Georg Enders

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr.med. Tanja Herrler

Dekan: Prof. Dr.med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2017

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	7
2 Einleitung.....	8
2.1 Historie der Nierentransplantation.....	8
2.2 Nierenversagen	9
2.2.1 Akutes Nierenversagen.....	9
2.2.2 Chronisches Nierenversagen	9
2.2.3 Nierentransplantation.....	10
2.3 Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation	12
2.3.1 Akute T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion	12
2.3.2 Akute Antikörper-vermittelte Abstoßungsreaktion	13
2.3.3 Chronische Abstoßungsreaktion.....	15
2.4 Pathomechanismus des Ischämie-Reperfusionsschadens.....	16
2.5 Mesenchymale Stammzellen	19
3 Material und Methoden	23
3.1 Zellkultur	23
3.1.1 Zellen und Medien.....	23
3.1.2 Zellkulturbedingungen.....	23
3.1.3 Passageprotokoll hMSC	23
3.1.4 Aufbau der Neubauerzählkammer.....	24
3.1.5 Zellzählung mittels Neubauerzählkammer.....	24
3.1.6 Berechnung der Zellkonzentration	25
3.2 Histologie.....	25
3.2.1 Herstellung von Paraffinschnitten	25
3.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	26
3.3 <i>In Vivo</i> Experimente	27
3.3.1 Versuchsaufbau	27
3.3.2 Verwendete Tiere	28
3.3.3 Narkose	29
3.3.4 Nierenfunktionsbestimmung mittels 99m-Tc-MAG3-Szintigraphie.....	30
3.3.5 Bildanalyse	30
3.3.6 Murines Nierenischämie-Reperfusionsmodell	31
3.3.7 Intervention.....	32
3.3.8 Renale- Perfusionsmessung.....	32
3.3.9 Subkapsuläre Druckmessung.....	33
3.4 Statistische Analyse	33
4 Ergebnisse.....	34
4.1 Subkapsuläre Druckmessung.....	34
4.2 Nierenfunktionskurven und Nierenfunktionsanalyse	35
4.3 Laser-Doppler-Perfusionsmessung.....	38

4.4 Histologie.....	39
4.4.1 Gesunde Niere	39
4.4.2 Ischämie Niere	40
4.4.3 Ischämische Niere mit Mikrokapsulotomie.....	40
4.4.4 Ischämische Niere unter MSC-Therapie	41
4.4.5 Ischämische Niere mit MSC-Therapie und Mikrokapsulotomie.....	42
5 Diskussion.....	43
5.1 Histologische Auswirkungen der Ischämie-Reperfusion	43
5.2 Auswirkungen von Ischämie-Reperfusion auf die Nierenfunktion	46
5.3 Auswirkungen der Ischämie-Reperfusion auf die Nieren-Perfusion.....	49
5.4 Auswirkungen der Mikrokapsulotomie auf die Nierenregeneration nach Ischämie-Reperfusion	53
6 Zusammenfassung und Ausblick.....	56
7 Danksagung	57

Eidesstattliche Versicherung

Lebenslauf

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	schematische Darstellung zur Pathogenese einer Transplantationsabstoßung [15].....	12
Abbildung 2	Nephron[1]	16
Abbildung 3	circulus vitiosus bei Ischämie[2]	17
Abbildung 4	Schematische Darstellung einer Neubauer Zählkammer	24
Abbildung 5	schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	28
Abbildung 6	Narkosemittel und deren Dosierung	29
Abbildung 7	Subkapsulärer Druck nach Ischämie-Reperfusion [43].....	34
Abbildung 8	Clearance-Werte(FUR) in prozentualer Darstellung zum Ausgangswert.....	36
Abbildung 9	Nierenfunktionskurven in prozentualer Darstellung zur Injektionsdosis	37
Abbildung 10	Nierenperfusion ischämischer zu kontralateraler nicht ischämischer Niere.....	38
Abbildung 11	Gewebeschnitt durch gesunde Niere HE-Färbung 100x Vergrößerung	39
Abbildung 12	Gewebeschnitt Niere mit 45 Minuten Ischämie ohne Therapie HE-Färbung 100x Vergrößerung.....	40
Abbildung 13	Gewebeschnitt Niere mit 45 Minuten Ischämie und Mikrokapsulotomie HE Färbung 100x Vergrößerung.....	40
Abbildung 14	Gewebeschnitt Niere mit 45 Minuten Ischämie und anschließender MSC-Therapie HE Färbung 100x Vergrößerung	41
Abbildung 15	Gewebeschnitt Niere mit 45 Minuten Ischämie mit Mikrokapsulotomie und MSC-Therapie HE Färbung 100x Vergrößerung	42

Abkürzungsverzeichnis

AFN	Atipamezol, Flumazenil und Naloxon
ANV	akutes Nierenversagen
AVAR	Antikörper vermittelte Abstoßungsreaktion
CD	cluster of differentiation
EPC	endothelial progenitor cell
FUR	fractional uptake rate
GFP	green fluorescent protein
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HLA	human-leukocyte-antigen
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
ICAM	intercellular adhesion molecules
i.v.	intravenös
MMF	Medetomidin, Midazolam, Fentanyl
mRNA	messenger RNA
MSC	mesenchymal stem cell
PBS	phosphate buffered saline
ROI	region of interest
SDF-1	chemokine stromal cell-derived factor-1
TNF	tumor nekrosis factor
TGF-1	transforming growth factor 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
^{99m} Tc-MAG3	Technetium-99m-Mercaptoacetyltriglycin

1 Zusammenfassung

Inflammation und Ödembildung nach renaler Ischämie-Reperfusion können zu irreversiblen Nierenfunktionsstörungen führen. Zurzeit stehen in der Klinischen Praxis keine effektiven spezifischen Behandlungsmöglichkeiten des Ischämie-Reperfusionsschadens zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob eine Stammzellen-vermittelte Therapie einen möglichen Behandlungsansatz darstellen könnte. Da im Mausmodell gezeigt werden konnte, dass renale Ischämie-Reperfusion zu einer Erhöhung des intarenalen Druckes führt, stellte die Mikrokapsulotomie der Nierenkapsel einen viel versprechenden Ansatz dar, um durch Druckentlastung Schäden infolge renaler Ischämie-Reperfusion zu vermindern. Darüber hinaus schien die Stammzelltherapie mit mesenchymalen Stammzellen (MSC) aufgrund ihrer immunmodulatorischen und regenerativen Wirkung einen erfolgsversprechenden Therapieansatz zu liefern. In der vorliegenden Arbeit wurde im xenogenen Nierenischämie-Reperfusionsmodell mit Balb/c nu/nu Mäusen, die einer unilateralen warmen Ischämie von 45 Minuten unterzogen wurden, die Wirkung von humanen MSC allein, alleiniger Mikrokapsulotomie, sowie mögliche synergistische Effekte beider Therapien untersucht. Die Nierenfunktion wurde seitengetreunt szintigraphisch mittels des radioaktiven Tracers ^{99m}Tc -MAG3 quantifiziert. Als Untersuchungszeitpunkte wurden vier Tage vor Ischämie-Reperfusion, sowie der zweite und achtzehnte postoperative Tag gewählt, um sowohl die kurzfristigen, wie auch die längerfristigen Veränderungen erfassen zu können. Einundzwanzig Tage nach Ischämie-Reperfusion erfolgte eine Nierenperfusionsmessung mit Hilfe einer Laser Doppler Sonde und die Gewebeentnahme beider Nieren zur anschließenden histologischen Begutachtung mittels HE-Färbung. Ischämie-Reperfusion führte in der Kontrollgruppe zu ausgeprägten Gewebeschäden, Verminderung der Perfusion und einem deutlichen Abfall der renalen Clearance. Histomorphologisch wiesen die Mikrokapsulotomie- und Mikrokapsulotomie/MSC-Versuchsgruppen eine deutlich geringere Schädigung des Nierengewebes auf als die Kontrollgruppe. Weiterhin zeigten die Stammzelltherapierten Versuchsgruppen eine deutlich geringere leukozytäre Infiltration als die Kontroll- und reine Mikrokapsulotomiegruppe. Die funktionelle Nierenfunktion stellte sich in den Therapiegruppen tendenziell verbessert dar, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

2 Einleitung

2.1 Historie der Nierentransplantation

Seit jeher übte die Heilung von Krankheiten durch Transplantation von Organen eine ganz besondere Anziehungskraft auf den Menschen aus. Erste Mythen über Organtransplantationen finden sich bereits in Indien im frühen 12. vorchristlichen Jahrhundert, sowie in China im 3. Jahrhundert vor Christus. Die Grundvoraussetzungen für eine erfolgreiche Transplantation fanden sich aber erst Anfang des 20. Jahrhunderts; durch die Einführung von Hygiene, Antisepsis, Fortschritte in Gefäßchirurgie und Narkoseverfahren wurden diese erst möglich gemacht. [3] Die erste erfolgreiche autologe Nierentransplantation führte der Wiener Chirurg H. Ullman 1902 an einem Hund durch, wobei sich die transplantierte Niere nur für fünf Tage als funktionstüchtig erwies. Die Entdeckung der Blutgruppen im Jahre 1930 durch Karl Landsteiner und der erworbenen immunologischen Toleranz durch Sir Brian Medawar 1944 waren weitere Meilensteine in der Transplantationsmedizin. Ab dem Jahre 1952 ermöglichten Entwicklungen in der Medizintechnik die erste erfolgreiche Lebend-Nierentransplantation. Diese wurde an eineiigen Zwillingen im Jahre 1954 durch Dr. Joseph Murray vorgenommen, wofür er 1990 den Nobelpreis für Medizin erhielt [4]. 1958 entdeckte Professor Dausset das Human-Leukocyte-Antigen-System (HLA-System) , mit dessen Hilfe das Immunsystem zwischen eigenem und fremdem Gewebe unterscheiden kann. In den darauffolgenden Jahren wurde immer deutlicher, dass zum besseren Organerhalt das Immunsystem nach einer Transplantation unterdrückt werden muss [4, 5]. Der Durchbruch im Transplantatüberleben wurde dann durch Suppression des Immunsystems mittels einer Pilzkultur erreicht, die 1970 in der Hardanger Region gefunden wurde. Die Schweizer Firma Sandoz entwickelte auf dem Hintergrund dieser Entdeckung daraus die Substanz Cyclosporin A, einen Calcineurinhemmer, der etwa 300mal stärker auf Lymphozyten wirkt als auf andere Zelllinien. Auf diese Weise konnten die Überlebensraten von Transplantaten durch verminderte Abstoßungsreaktionen drastisch gesteigert werden.[4] Cyclosporin A wurde dann 1978 in England erstmals zugelassen und bei Organtransplantationen beim Menschen erfolgreich eingesetzt.[3] Seitdem wurden noch zahlreiche weitere Immunsuppressiva entwickelt, die nach aktuellen Leitlinien kombiniert eingesetzt werden. Seit 2004 sind auch Transplantationen bei Inkompatibilität der Blutgruppen von Spender und Empfänger möglich. Die Vergabe von Organen erfolgt heutzutage in Eu-

ropa zentral durch Eurotransplant, das 1967 vom Niederländer van Rood gegründet wurde. [6]

2.2 Nierenversagen

2.2.1 Akutes Nierenversagen

Das Krankheitsbild des Nierenversagens wird in ein akutes und ein chronisches Geschehen unterteilt. Während chronisches Nierenversagen oftmals Dialysepflichtigkeit oder eine Nierentransplantation nach sich zieht, geht man auch heute noch davon aus, dass sich die Nierenfunktion nach akutem Nierenversagen (ANV), trotz einer hohen Mortalität von etwa 50% wieder vollständig erholen kann. Dies ist in der Fähigkeit des Nierengewebes begründet, sich nach subletalen Schäden wieder regenerieren zu können [7] Klinisch wird das akute Nierenversagen als Syndrom angesehen, bei dem es zu einem plötzlichen Abfall der glomerulären Filtrationsrate mit Verringerung von Exkretion, Prozessierung und Produktion des Ultrafiltrates kommt. Diese Veränderungen sind durchschnittlich bei 7% aller stationär behandelten Patienten zu finden. [8] Das ANV wird ätiologisch in ein prärenales, intrarenales und postrenales Geschehen unterteilt. Das prärenale ANV, das 60% aller ANVs ausmacht, ist durch verminderte Perfusion der Niere bedingt [9], die meistens durch Schock, große operative Eingriffe und Hypovolämie ausgelöst wird. [10] Intrarenales ANV hingegen entsteht meist auf dem Boden einer akuten interstitiellen Nephritis, akuter Tubulusnekrose oder akuter Glomerulonephritis und macht 35% aller ANVs aus. Harnabflussbehinderungen mit konsekutivem Harnstau bis in die Nieren führen zum postrenalen ANV und machen 5% aller ANVs aus. Die Schockbehandlung und die Ursachenbeseitigung eines ANV stellen die primären Therapieziele dar. [9] Die durch das ANV induzierte ischämische Schädigung der Niere führt zu einer Verringerung des renalen Blutflusses und einer direkten Schädigung der proximalen Tubuluszellen, was nach neuesten Studienergebnissen zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten chronischer und progredienter Funktionsstörung der Niere führen könnte. [7]

2.2.2 Chronisches Nierenversagen

Die chronische Nierenschädigung ist ein langsamer, progredienter Prozess, der oft mit erhöhtem Lebensalter und zahlreichen Begleiterkrankungen assoziiert ist. [11]. [12] So stellen arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ I und II, Glomerulonephritiden, Nephrolithiasis, Infektionen und genetische Ursachen, wie die autosomal dominant vererb-

ten polyzystischen Nieren wichtige Risikofaktoren für die Entwicklung eines chronischen Nierenversagens dar. Weitere negative Einflüsse, die die Entstehung eines chronischen Nierenversagens fördern sind das Rauchen, Ethanol- und Drogenabusus, Dyslipidämie, Medikamentennebenwirkungen und die ethnische Herkunft. [13] Um eine geschädigte Niere vor weiterem Schaden zu schützen werden die therapierbaren Risikofaktoren minimiert. So wird der arterielle Blutdruck optimal eingestellt, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System blockiert und kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Hypercholesterinämie mittels Statin behandelt. [12] Wird schließlich das Endstadium des chronischen Nierenversagens erreicht, ist der Patient auf eine Nierenersatztherapie angewiesen. Mögliche Optionen der Nierenersatztherapie sind Hämodialyse, Hämofiltration, Peritonealdialyse oder letztlich eine Nierentransplantation [13], wobei von den hier genannten Verfahren die Nierentransplantation die kostengünstigste [10] und für den Patienten am wenigsten Lebensqualitätseinschränkende Variante darstellt.

2.2.3 Nierentransplantation

Die Wartezeit für den Erhalt einer Spenderniere ist lang, was darin begründet ist, dass viel mehr Patienten ein Spenderorgan benötigen als Organe für eine Transplantation zur Verfügung stehen. So wurden im Jahr 2014 3119 Nieren transplantiert, aber über 10,000 Patienten warteten auf eine Spenderniere. (Eurotransplant,[14]) Generell muss bei Nierentransplantationen die Lebendspende, bei der meist ein Angehöriger eine seiner Nieren spendet, von der postmortalen Organspende, die nach Hirntod eines Spenders durchgeführt wird, unterschieden werden.[11, 15] Eine deutliche Verbesserung des kurzzeitigen Transplantatüberlebens, sowie eine Reduzierung einer akuten Abstoßungsreaktion sowohl bei lebend-als auch bei postmortem-gespendeten Nieren konnte durch die Einführung neuer Immunsuppressiva erreicht werden.[10] So liegt die Sterblichkeit innerhalb des ersten Jahres für nierentransplantierte Patienten bei lediglich 2-5%. Der Erfolg einer Transplantation hängt aber auch wesentlich von den Fähigkeiten des Operateurs, der Betreuung transplantierte Patienten, sowie der adäquaten Behandlung möglicher Komplikationen ab. Eine relativ häufige Komplikation nach postmortaler Spende bei Nierentransplantation ist ein verzögertes Einsetzen der Nierenfunktion (delayed graft function), was eine Dialyse in der ersten Woche nach Transplantation nötig macht.[10] Akute Abstoßungsreaktion und delayed graft function bilden hierbei die beiden wichtigsten Komplikationen in der frühen Phase nach Transplantation und begünstigen einen frühzeitigen Verlust des Transplantats.[10] [16]

Im Gegensatz zum frühen Transplantatüberleben, welches drastisch gesteigert werden konnte, ist es bisher nicht gelungen das Langzeitüberleben von transplantierten Nieren in den letzten Jahrzehnten wesentlich zu verbessern.[17] Dies ist einerseits in der erhöhten Begleit-Mortalität der transplantierten Patienten durch kardiovaskuläre Ereignisse, andererseits durch den Verlust des Transplantats durch chronische Transplantatnephropathie begründet.[18] Die hierbei auftretenden Schädigungen wie interstitielle Fibrose, Tubulusathrophie und chronische Schäden an den Glomeruli der Niere sind unspezifische Antworten auf Schäden unterschiedlicher Genese; Antikörpervermittelte Endothelaktivierung, Calcineurin-Inhibitor-Toxizität, chronische Entzündungen, Mechanismen des angeborenen Immunsystems, sowie Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie stellen einige dieser Ursachen dar. [15]

2.3 Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation

2.3.1 Akute T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion

Die Abstoßung eines Transplantats wird über verschiedene Elemente des Immunsystems vermittelt. So führen Antikörper-Bindung, Komplement-Aktivierung, T- und B-Zell-vermittelte Reaktionen besonders bei Tubulus- und Endothelzellen zu gravierenden Veränderungen in transplantierten Nieren. [15] Der durch die Transplantation entstandene Ischämie-Reperfusionsschaden führt primär zur Aktivierung von Toll-Like-Rezeptoren des natürlichen Immunsystems und zur Zytokinausschüttung. [19] Diese bedingen eine Chemokinausschüttung der Tubuluszellen, die wiederum neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten anlocken. Die Aktivierung des Immunsystems führt unter anderem durch natürliche Killer-Zellen-vermittelt zur Ausreifung von antigenpräsentierenden Dendritischen Zellen. Diese aktivieren mittels Antigenpräsentation über MHC II Oberflächenmoleküle und passende co-stimulatorische Faktoren, die T-Helfer-Zellen. (Abb.1) Sind T-Helfer-Zellen erst einmal aktiviert, so fördern sie die Proliferation von T-Zellen, die Produktion von Iso-Antikörpern durch B-Zellen, die Aktivierung von Makrophagen und die Umwandlung von naiven CD8+ T-Zellen in zytotoxische T-Lymphozyten. [15]

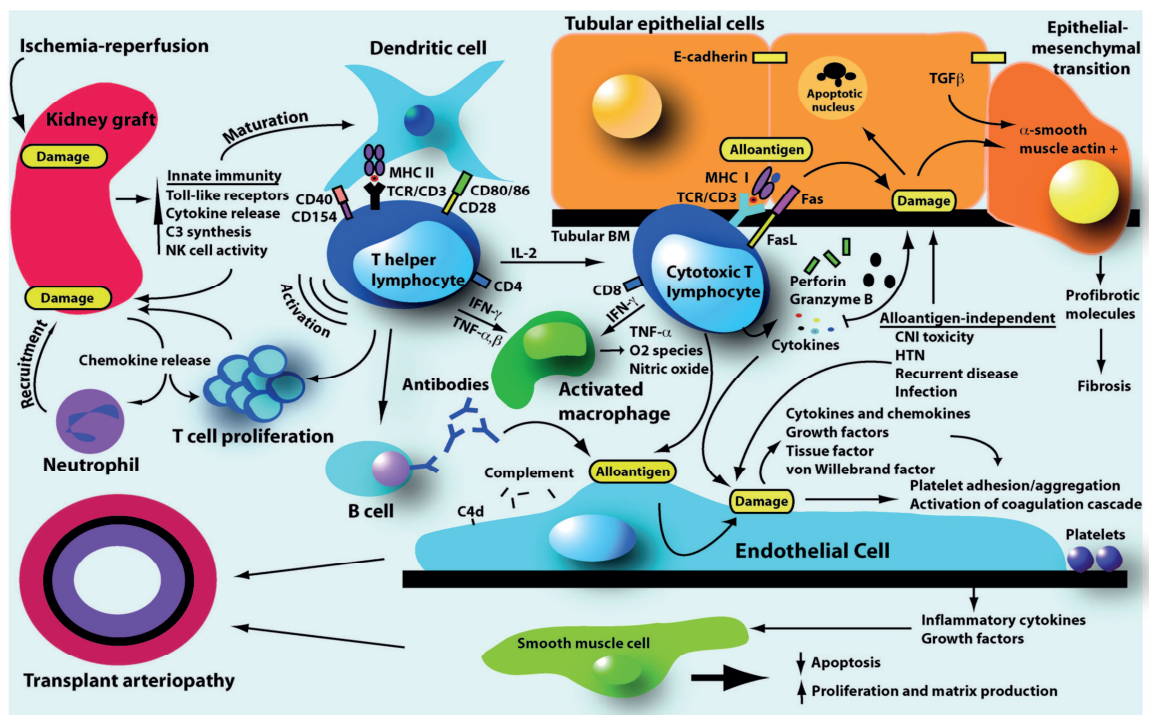


Abbildung 1 schematische Darstellung zur Pathogenese einer Transplantationsabstoßung [15]

Histologisch werden Abstoßungsreaktionen nach Banff klassifiziert. [20] Die akute T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion zeigt in der Histologie Einwanderung, hauptsächlich bestehend aus Makrophagen, CD4+ und CD8+ T-Zellen, mononuklearer Zellen in das Interstitium, was mit einer Entzündung von Tubuluszellen und manchmal auch von Arterien einhergeht. [20] Endarteritis, auch Endothelialitis genannt, die sich durch Infiltration des Subendotheliums, sowie der Intima mit diesen Zellen auszeichnet, ist pathognomonisch für eine Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion. [20] Die genaue Pathogenese dieses Vorgangs ist allerdings noch weitgehend unbekannt, wobei mehrere Theorien existieren, die besonders die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität an Nierenparenchymzellen sowie lokale Zytokinfreisetzung für die verantwortlichen Faktoren halten. Bei der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität werden Zielzellen von CD8+ zytotoxischen T-Zellen über MHC I vermittelt erkannt und mittels Perforin und Granzym B lysiert oder durch den Fas/FasL zytolytischen Signalweg zerstört. [21] Zytokine wiederum können entweder direkt die Tubuluszellen schädigen oder indirekt, indem sie über verschiedene Signalübertragungswege Effekte am Endothel und bei der Gefäßversorgung der Tubuluszellen bewirken. Eine selektive Expression von mRNA konnte in Nierenbiopsien und Urinproben bei Patienten mit akuter Abstoßungsreaktion für zytolytische T-Zell-assoziierte Moleküle und verschiedene Zytokine wie Interferon γ (IFN γ) Tumor Nekrose Faktor (TNF) α und β nachgewiesen werden, was die oben genannten Theorien bezüglich der akuten T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktion unterstützt.[15, 21] Welche Rolle die regulatorischen T-Zellen bei der akuten T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktion spielen wird zurzeit noch kontrovers diskutiert.[19]

2.3.2 Akute Antikörper-vermittelte Abstoßungsreaktion

Die akute Antikörper-vermittelte Abstoßungsreaktion (AVAR) die für ungefähr 25% der akuten Abstoßungsepisoden verantwortlich ist, wird inzwischen als eigenständige klinisch pathologische Ursache anerkannt. Sie kann in Kombination mit oder ohne begleitende T-Zell-vermittelter Abstoßung auftreten.[19] Die meisten Antikörper sind dabei gegen HLA-Antigene des Spenders gerichtet, aber es werden auch Antikörper-Reaktionen gegen Antigene beschrieben, die von Spender-Endothelzellen exprimiert werden. Risikofaktoren für das vermehrte Auftreten einer AVAR sind zu geringe Blutkonzentrationen der Immunsuppressiva, z.B. durch Non-Compliance des Patienten, sowie eine Frühsensibilisierung. [19] So wandern sofort nach Transplantation sowohl Dendritische Zellen des Spenders in regionäre Lymphknoten des Empfängers als auch

Dendritische Zellen des Empfängers in das frisch transplantierte Organ des Spenders ein. [22] Diese präsentieren dann den T-Helfer-Zellen des Empfängers Antigene über MHC II und tragen so zu erhöhten Abstoßungsraten bei. Klinisch lässt sich allerdings die AVAR nicht von einer T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktion unterscheiden, was eine Nierenbiopsie zur Ursachenabklärung nötig macht. Histologisch zeigt sich bei AVAR typischerweise eine Akkumulation von Monozyten und neutrophilen Granulozyten in peritubulären und glomerulären Kapillaren. [22] Die peritubulären Kapillaren sind oft erweitert und die Endothelzellen zeigen Ablösung der Basalmembran, Lyse und Apoptose. [23] Eine Tubulitis oder Endarteritis findet sich im Gegensatz zur T-Zell-vermittelten Abstoßung nur sehr selten. Da Antikörper selbst nur sehr unzuverlässig im menschlichen Körper nachzuweisen sind wird heutzutage die von Feucht entdeckte C4d Färbung zum Nachweis einer AVAR verwendet. C4d korreliert sehr stark mit dem histologischen Erscheinungsbild von Neutrophilie, fibrinöser Nekrose und spezifisch gegen den Spender gerichteten Antikörpern. [24] C4d ist ein inaktives Spaltprodukt des Komplementsystems, das bei heutigem Kenntnisstand keine relevante Funktion inne hat aber nach Freisetzung von Immunglobulin und C1 für mehrere Tage am Gewebe gebunden bleibt. Weiterhin lagert es sich in peritubulären Kapillaren ab und lässt sich mittels Immunfluoreszenz nachweisen. Sind bei Patienten C4d Ablagerungen nachzuweisen, so sind simultan bei 88-95% dieser Patienten auch Antikörper gegen HLA der Klassen I oder II zu finden. AVAR kann aber auch ohne nachweisbar zirkulierende Antikörper auftreten, was wahrscheinlich darin begründet liegt, dass sie vom Transplantat absorbiert werden.[19] AVAR sind stark mit der Fähigkeit von Antikörpern assoziiert eine Komplementaktivierung auszulösen. So zeigt sich, dass Antikörper wie die HLA Klasse I, die zu einer Aktivierung von Komplement führen, schwere humoral bedingte Abstoßungsreaktionen auslösen können, wohingegen Antikörper, die keine Komplementaktivierung nach sich ziehen die gleiche Wahrscheinlichkeit für eine AVAR aufweisen wie sie bei Patienten ohne nachgewiesene Antikörper zu finden ist. [25] [19] Die direkten Folgen der Komplementaktivierung sind Anlockung von Makrophagen und neutrophiler Granulozyten durch Chemokine, Auslösung von Vasokonstriktion mittels PGE₂, Ödembildung durch von Mastzellen produziertes Histamin, Hochregulation diverser Oberflächenmoleküle von Endothelzellen, Produktion von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen, sowie direkte Lyse der durch den Antikörper markierten Endothelzelle mittels eines Membranangriffkomplexes. [19] Antikörper können aber nicht

nur durch Komplementaktivierung markierte Zellen lysieren, sondern auch über einen komplementunabhängigen Weg; die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität. Dabei binden natürliche Killerzellen und Makrophagen an der Fc-Region des Antikörpers und lysieren anschließend die Antikörper-markierte Zelle. [19] In allen Antikörper-vermittelten Abstoßungsreaktionen kommt es simultan auch zu mikrovaskulären Thrombosen. Tritt eine Verletzung des Endothels ein, so setzt dieses von Willebrand-Faktor frei und ermöglicht so den Thrombozyten die Bindung an freiliegendes Kollagen und es kommt zur Thrombozytenaggregation, was sich wiederum negativ auf das Transplantatüberleben auswirkt. [26]

2.3.3 Chronische Abstoßungsreaktion

Die chronische Abstoßungsreaktion ist sowohl durch zelluläre als auch durch humorale Mechanismen zu erklären. Chronische Veränderungen finden sich in den Glomeruli, den Gefäßen, den Tubuli und dem Interstitium. Histologisch lässt sich die chronische Abstoßungsreaktion in Glomerulopathie, peritubuläre Kapillarschädigungen, Arteriopathie, so wie weniger spezifisch in interstitielle Fibrose und Tubulusathrophie unterteilen. [15] Können bei einem Patienten C4d Ablagerungen in peritubulären Kapillaren und Spender spezifische zirkulierende Antikörper nachgewiesen werden, so ist dies bei simultanem Vorkommen eines der oben genannten Schäden beweisend für das Vorliegen einer chronischen Antikörper-vermittelten Abstoßungsreaktion und verschlechtert die Prognose des Patienten deutlich. [19] Die durch Spender-spezifische Antikörper-vermittelte Abstoßungsreaktion zeigt histologisch eine Duplikation und Vielschichtung der Basalmembran der Glomeruli, sowie der peritubulären Kapillaren. Die Transplantat-Arteriopathie zeigt sich in der Histologie durch Vielschichtung und Verdickung der Intima ohne Duplikation der Elastika, was eher als Folge von arterieller Hypertonie auftritt. Weiterhin stellen interstitielle Fibrose und Tubulusathrophie, welche durch Antikörper-vermittelte Schädigung, Toxizität von Calcineurin-Inhibitoren, sowie T-Zell-vermittelter Abstoßung entstehen, ein wichtiges Merkmal einer chronischen Abstoßung dar. Auf die Entstehung einer Fibrose durch den Übergang von epithelialen Tubuluszellen in mesenchymale Zellen wird weiter unten noch genauer eingegangen. [27] [19]

Das zukünftige Ziel für Transplantationen wird es daher sein, ein Langzeitüberleben des Transplantats mit sehr niedriger oder gar ohne Immunsuppression zu erreichen, da die

meisten Schäden durch das Immunsystem oder die immunsuppressionsbedingten Nebenwirkungen hervorgerufen werden.[19]

2.4 Pathomechanismus des Ischämie-Reperfusionsschadens

Obwohl die Masse der Nieren nur 2% des Körpergewichtes ausmacht, so erhalten die Nieren doch ungefähr 25% des Herzzeitvolumens. Dies zeigt deutlich, dass für die genaue Regulation des Flüssigkeitshaushaltes, sowie die exakte Einstellung der Elektrolyte im Körper eine sehr hohe Filtration in den Glomeruli der Niere notwendig ist. Weiterhin ermöglicht ein renaler Autoregulationsmechanismus eine konstante glomeruläre Filtrationsrate (GFR) auch bei großen arteriellen Blutdruckschwankungen. Dieser Autoregulationsmechanismus kann zwischen 80 und 180mmhg aufrechterhalten werden. [8]

Unter physiologischen Bedingungen erhält der Kortex der Niere, in dem der Großteil der Glomeruli gelegen ist, den größten Anteil des in die Niere strömenden Blutes. Der medulläre Teil der Niere hin-

gegen erhält über die Vasa recta nur ungefähr 10% des Blutflusses. [28] Eine akute Mangeldurchblutung betrifft allerdings nicht alle Teile der Niere im gleichen Ausmaß. So kommt es eher zu lokalen als zu generalisierten Durchblutungsstörungen, die auf Grund anatomischer Gegebenheiten bevorzugt im äußeren medullären Teil auftreten. [29] Da der tubuläre Transport im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife, sowie im S3-Segment des Pro-

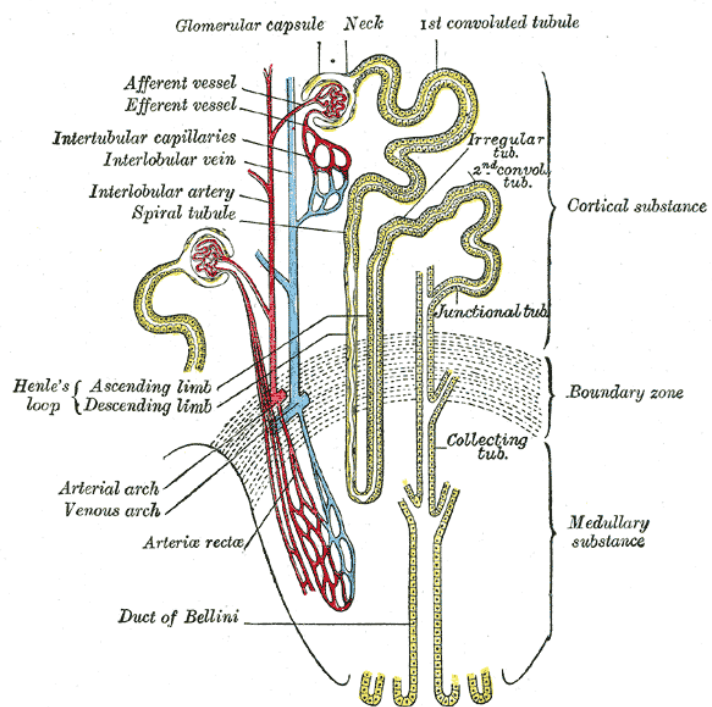


Abbildung 2 Nephron[1]

ximalen Tubulus der Niere einen sehr sauerstoffverbrauchenden Prozess darstellt, muss sich die Niere bei Mangeldurchblutung vor Hypoxie schützen. Dies geschieht durch eine Reduktion der GFR, da auf diese Weise der Sauerstoffverbrauch verringert und so ein Sauerstoffgleichgewicht wieder hergestellt werden kann. Dieser protektive Effekt führt allerdings zur Bildung von Sauerstoffradikalen, welche wiederum zu einer

schlechteren Durchblutung in der Medulla und einem erhöhten tubulären Transport in der aufsteigenden Henle-Schleife führen. Dies verdeutlicht, dass dieser primär protektive Effekt in der Reperfusionsphase weitere Schäden erzeugt, da bei Reperfusion auf Grund einer erhöhten tubulären Transportrate der Sauerstoffverbrauch drastisch ansteigt und somit das Sauerstoffgleichgewicht sich weiter in Richtung eines Sauerstoffmangels verschiebt.[29] Die primär durch die Ischämie verursachten Schäden lösen zahlreiche Folgereaktionen aus, aus welchen mikrovaskulären Veränderungen resultieren.

Die beobachteten Veränderungen an den Endothelien umfassen das Auseinanderreißen des Actin-Zytoskelettes sowie den Verlust der Glykocalyx, die eine weitere Schutzbarriere darstellt. Durch das Einreißen des Zytoskelettes verliert die einzellige Endothelschicht ihre Barrierefunktion und es kommt zum Flüssigkeitsüber-

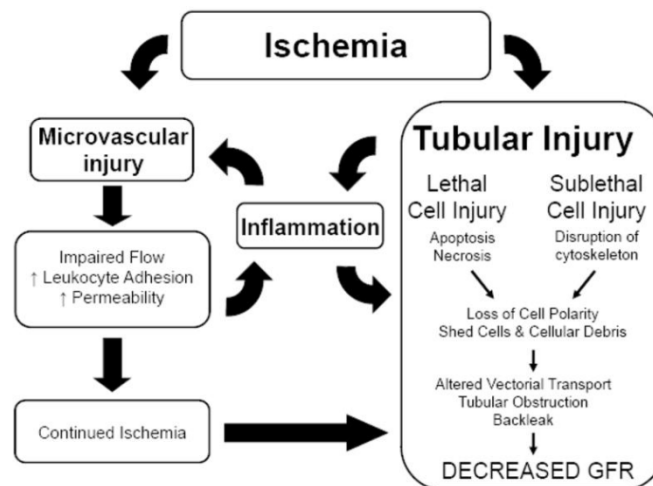


Abbildung 3 *circulus vitiosus bei Ischämie*[2]

tritt in das Interstitium. Das so entstandene interstitielle Ödem führt zu erhöhtem intrazellulärem Druck, sowie einer daraus folgenden Obstruktion der Tubuli. [2] Die der Ischämie folgende Immunantwort führt zu vermehrter Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen, sowie zu einer erhöhten Expression von intercellular adhesion molecules (ICAM), wie ICAM 1, P- und E-Selektin, was die Einwanderung von weiteren Leukozyten in das ischämische Areal begünstigt. Dadurch wiederum verstärkt sich die inflammatorische Immunantwort und führt zu einer Verschlechterung der Durchblutung im Endstromgebiet, was unter anderem durch einen Aufstau an roten Blutkörperchen noch verstärkt wird. Der aufsteigende Teil der Henle-Schleife ist hiervon am stärksten betroffen. Die Kombination all dieser Effekte führt zu einer Vergrößerung des ursprünglichen Ischämieareals, da dieses schlechter mit Sauerstoff versorgt und der Abtransport toxischer Stoffe erschwert wird. Als Folge davon entstehen weitere tubuläre Schäden, sowohl die GFR, als auch die Nierenfunktion verschlechtern sich. [29]

Für die Entstehung einer chronischen Nierenschädigung nach vorangegangenen akutem Nierenversagen existieren derzeit mehrere Hypothesen. Eine interessante Entdeckung machten Fine et al. in Nierenbiopsien von Patienten mit chronischem Nierenversagen. Er stellte fest, dass deutlich weniger Kapillaren im peritubulären Bereich zu finden waren als bei gesunden Vergleichspersonen und stellte daraufhin eine Hypothese zur chronischen Hypoxie auf. Seine Hypothese besagt, dass ein primärer glomerulärer Schaden eine Verminderung des postglomerulären Blutflusses zur Folge habe, was daraufhin eine Verminderung der Kapillardichte im peritubulären Bereich nach sich ziehe. Dadurch entstehe ein hypoxisches Milieu, welches fibrotische Umbauprozesse begünstige und wiederum benachbarte Kapillare negativ beeinflusst[30]

Ein weiterer Grund für die Entstehung einer chronischen Nierenschädigung ist die Umwandlung von epithelialen in mesenchymale Zellen nach primärer Nierenschädigung. Eine inflammatorische Immunantwort nach Nierenschädigung setzt profibrotische Zytokine, wie z.B. transforming growth factor 1 (TGF-1) frei, welche eine Umwandlung von renalen epithelialen und endothelialen Zellen zu Myofibroblasten bewirken. [31] Dies führt zu einer vermehrten Bildung von Myofibroblasten und Fibroblasten im Nierenparenchym, welche durch Atrophie und tubulointerstitielle Fibrosen zusätzliche Schädigungen verursachen. [32] Weiterhin fördert Hypoxie die Fibrosierung nicht nur durch Bildung von Fibroblasten, sondern ebenso durch Verlangsamung des Abbaus fibrotischen Materials mittels Metalloproteinasen, wie z.B. Metalloproteinase-I. So zeigt sich bei Hypoxie sowohl eine erniedrigte Aktivität, als auch eine verminderte Expression verschiedener Metalloproteinasen. [33]

2.5 Mesenchymale Stammzellen

Stammzellen sind durch ihre Fähigkeit definiert, über einen längeren Zeitraum undifferenziert zu bleiben ohne die Fähigkeit zu verlieren, sich weiter differenzieren sowie sich unlimitiert selbst erneuern zu können. [34, 35] Dabei wird unterschieden, ob sich die Stammzelle entlang eines Keimblattes, also unipotent in meso-, endo- oder ektoderm entwickeln kann, oder ob sie sich entlang zweier Keimblätter, also multipotent ausdifferenzieren vermag. Sofern eine Stammzelle sich entlang aller drei Keimblätter weiter differenzieren kann, spricht man von einer pluripotenten Stammzelle.[34] Während sich pluripotente embryonale Stammzellen nur im frühen Embryo finden, enthalten die meisten Organe nach Geburt spezifische Stammzellen, die zur Erhaltung und Regeneration des betroffenen Organs beitragen. Diese Stammzellen sind allerdings schon weiter differenziert und können sich nur noch in bestimmte Zelllinien ausdifferenzieren. Beispiele hierfür sind die epithelialen Stammzellen der Epidermis und der intestinalen Krypten, neuronale Stammzellen im zentralen Nervensystem sowie Satellitenzellen im Muskelgewebe. [36]

Im adulten Knochenmark des Menschen lassen sich zwei Arten von Stammzellen finden. Zum einen die hämatopoetischen Stammzellen, die den Ursprung für die Erythropoese bilden sowie den ersten gemeinsamen Schritt für die Bildung von Thrombozyten, B- und T-Lymphozyten, Granulozyten und der Natürlichen-Killer-Zellen darstellen. Zum anderen die mesenchymalen Stammzellen (MSC), die erstmals vor ungefähr vierzig Jahren durch Friedenstein et al. als adhärente Zellen mit fibroblastenähnlichem Erscheinungsbild und der Fähigkeit sich in Osteozyten, Chondrozyten, Adipozyten, Tendozyten und Myozyten differenzieren zu können, beschrieben wurden. [34] Um eine einheitliche Zuordnung zu den MSC gewährleisten zu können legte die International Society of Cryotherapy drei Kriterien fest. So müssen in Kultur genommene MSC die Fähigkeit aufweisen in einer aus Plastik bestehenden Kulturflasche Adhärenz auszubilden. Weiterhin müssen die Cluster of Differentiation (CD), CD105, CD73 und CD90 in über 95% der Zellen exprimiert werden, bei gleichzeitiger Abwesenheit von: CD34, CD45, CD14 oder CD11B, CD79A oder CD19. Weiterhin muss das Human Leukocyte Antigen-DR (HLA-DR) in über 95% der Zellen zu finden sein. Darüber hinaus müssen MSC noch die Eigenschaft aufweisen, mindestens in Chondrozyten, Osteozyten und Adipozyten differenzieren zu können. [34]

Der größte Anteil mesenchymaler Stammzellen im menschlichen Körper findet sich im Knochenmark [37], wobei MSC auch dort nur 0,001%-0,01% der kernhaltigen Zellen ausmachen. [34] Kleinere Mengen an MSC sind im menschlichen Körper an vielen weiteren Stellen anzutreffen, sodass MSC bislang aus fast jedem Gewebetyp, wie z.B. Gehirn, Leber, Knochenmark, Fett, Skelettmuskel, Fruchtwasser, Haarfollikeln und Periost isoliert und kultiviert werden konnten. [34] Der Begriff mesenchymale Stammzelle ist allerdings irreführend, da neue Erkenntnisse gezeigt haben, dass MSC sich nicht nur mesodermal, also in Chondrozyten, Osteoblasten und Adipozyten ausdifferenzieren können, sondern auch sowohl endodermal, in Hepatozyten-ähnliche Zellen, als auch ektodermal in Neuroglia und Neuronen.[35] In der Folge müsste man die MSC aufgrund ihrer Eigenschaft sich entlang aller drei Keimblätter auszudifferenzieren zu können den pluripotenten Stammzellen zurechnen. Allerdings handelt es sich bei den MSC, zumindest ex vivo, um keine echten Stammzellen, da sie im Gegensatz zu den hämatopoetischen Stammzellen keine Telomeraseaktivität aufweisen. Daher kommt es durch wiederholte Reproduktion zu einer Telomerverkürzung, was das Teilungsvermögen der MSC einschränkt.[35] Auf Rezeptor Ebene weisen MSC Besonderheiten auf, die sie für den therapeutischen Einsatz interessant machen. So konnte gezeigt werden, dass auf der Oberfläche von MSC zwar MHC I exprimiert wird aber weder MHCII noch die Co-Stimulierenden Faktoren CD40, CD80, CD86 nachzuweisen sind, was eine allogene Transplantation ohne nachfolgende Immunsuppression möglich macht. [34, 38] Für den klinischen Einsatz sind MSCs auch deswegen interessant, weil sie leicht aus dem Knochenmark zu gewinnen sind und sich ex vivo sehr einfach und schnell ohne einen nennenswerten Wirksamkeitsverlust zu klinisch relevanten Mengen expandieren lassen. Durch das Fehlen von MHC II Molekülen auf der Oberfläche von MSC ist es ihnen nicht möglich, Antigene direkt zu repräsentieren; sie sind daher für das Immunsystem des potentiellen Empfängers praktisch unsichtbar. [38] Eine zentrale Rolle nehmen MSC durch ihre immunmodulatorische Fähigkeit im Körper ein. So werden bei MSC sowohl immunverstärkende als auch immunsupprimierende Effekte im menschlichen Körper beobachtet. Bei Vorliegen einer Entzündung im Körper gelangen MSCs gezielt über einen Chemokingradienten, welcher über chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) vermittelt wird, zum inflammatorischen Areal. [39] Dort angekommen unterstützen MSC als Antigen-Präsentierende-Zellen mittels eines autokrinen γ -Interferon abhängigen Signalwegs das Immunsystem und verstärken so die Immunreak-

tion. Wird allerdings ein bestimmter Spiegel an γ -Interferon überschritten, so inhibieren MSC direkt die Antigenpräsentation und fördern die Immunsuppression. Dies geschieht deshalb, weil hohe Spiegel an γ -Interferon bei MSCs zu einer Hochregulation eines Oberflächenmoleküls B7-H1 führen, das über Zell-Zell Kontakte immunsupprimierende Wirkung entfaltet.[34] Auf diesem Wege können Schäden, die durch eine reaktiv ausgelöste überschwängliche Entzündungsreaktion hervorgerufen werden verhindert oder zumindest vermindert werden. [34] Weiterhin sezernieren MSC eine Reihe von bioaktiven Faktoren. [40] Wachstumsfaktoren, wie z.B. vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatic growth factor, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) und antiapoptotische Zytokine, die im geschädigten Gebiet freigesetzt werden fördern die Neoangiogenese, sowie die Gewebswiederherstellung.[37] Andere lösliche Faktoren führen zum Arrest von B-Lymphozyten in der G0/G1 Phase, verhindern die Ausdifferenzierung und beeinträchtigen die Wanderung von B-Lymphozyten. Die Funktion von Monozyten wird kontaktunabhängig über IL1- β moduliert, was wiederum bei den MSC zu einer vermehrten Expression von TGF- β 1 führt. Das sezernierte TGF- β 1 führt zu einer Hemmung alloreaktiver T-Lymphozyten und einer verminderten Expression von aktivierenden Oberflächenmolekülen, wie CD 25, CD38, CD69. Außerdem werden auch Natürliche-Killer-Zellen, dendritische Zellen und T-Lymphozyten immunmodulierend beeinflusst.[34]

Auf Grund der zuvor genannten Eigenschaften der MSCs, sich in eine Vielzahl von Zellen weiter zu differenzieren, an den Ort der Entzündung oder Schädigung zu wandern und dort zum einen die ortsansässigen Progenitorzellen zur Proliferation anzuregen und die Wiederherstellung geschädigten Gewebes mit Hilfe von Zytokinen positiv zu beeinflussen[41], bieten sich MSCs sehr gut für eine Zelltherapie an. Diese wurde bereits erfolgreich am Menschen und im Tierversuch bei verschiedenen Grunderkrankungen angewandt. So zeigten sich erhebliche anti-entzündliche und regenerative Effekte bei Patienten mit Schlaganfall, Herzinfarkt, Rückenmarksverletzung, Meniskusdegenerationen, Bänderentzündungen und akutem Nierenversagen.[40] Da es allerdings noch große Schwankungen in der Wirksamkeit der MSC-Zelltherapie gibt, muss noch genauer untersucht werden, wie sich MSC in vivo nach Injektion im menschlichen Körper verhalten. [40]

Der Grund für Transplantatversagen nach Nierentransplantation ist ein komplexes Zusammenspiel aus erlittenem Ischämie-Reperfusionsschaden, akuter und chronischer Abstoßungsreaktion und Komorbiditäten des Patienten. In dieser Arbeit soll nun im Mausmodell untersucht werden, ob sich gerade Langzeitschäden nach Ischämie-Reperfusion durch eine Therapie mit hMSC oder durch Kombination von hMSC mit einer Druckentlastungstherapie der Nierenkapsel verhindern lassen.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zellen und Medien

Immortalisierte Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) wurden von Prof. Schieker, Chirurgische Klinik Innenstadt, Ludwigs-Maximilians-Universität freundlicherweise zur Verfügung gestellt, kultiviert und bei -80°C konserviert. Die hier verwendeten hMSCs entstammten aus der 110ten Passage.[42] Das Grundmedium RPMI (*Firma Lonza, Valais, Schweiz*) wurde mit 10% FCS (*Lonza*) versetzt.

3.1.2 Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung der hMSC erfolgte im Inkubator (*Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland*) bei 37° C und 5% CO₂-Athmosphäre. Zur Kultivierung wurden hMSCs in einer Konzentration von 6×10^3 Zellen/cm² in einer T75 biocoat Flasche (*type 1 rat tail collagen der Firma Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland*) mit 14ml Nährmedium angesetzt. Der Medienwechsel erfolgte regelmäßig alle 2-3 Tage. Bei Erreichen einer Zellkonfluenz von 90% erfolgte die Passagierung der Zellen. Hierbei wurde das alte Nährmedium entfernt, die adhärenen Zellen mit PBS (*Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland*) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mittels einer Trypsin/EDTA Lösung abgelöst und auf weitere T75 biocoat Flaschen gesplittet und weiter kultiviert. Alle Arbeiten mit den hMSCs fanden unter kontinuierlichem Luftabzug und sterilen Bedingungen in einer Sterilbank statt. (*Herasafe von Thermo Fisher Scientific Inc., USA*)

3.1.3 Passageprotokoll hMSC

Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte des Passagenprotokolls hMSC aufgelistet:

1. Nährmedium und PBS bei Raumtemperatur warm werden lassen
2. Nährmedium aus Kulturflasche entfernen und adhärenen Zellen mit 15ml PBS waschen
3. Zellen mit 5ml Trypsin/EDTA Lösung inkubieren und Kulturflasche für drei Minuten in den Brutschrank geben
4. Lichtmikroskopische Kontrolle, ob alle Zellen abgelöst wurden
5. Zugabe von mind. 5ml Nährmedium, um die Trypsinlösung zu neutralisieren
6. Zellsuspension mittels Akku-Pipettierhilfe (*Heathrow Scientific LLC, Illinois, USA*) in ein 50ml Falcon (*BD Biosciences, Bedford, USA*) überführen und bei 7200rpm für 7min zentrifugieren (*Multifuge 3SR, Heraeus, UK*)

7. Überstand abgießen und Zellpellet mit 10ml Nährmedium resuspendieren
8. 20µl der Zellsuspension in ein 0,5ml Eppendorfer für die Zellzählung pipettieren
9. Zellsuspension erneut bei 7200rpm für 7 min zentrifugieren
10. Zellpellet mit Nährmedium (ml-Anzahl je nach Splitting/Zellzahl) resuspendieren und in T75 biocoat Flaschen pipettieren.

3.1.4 Aufbau der Neubauerzählkammer

Der optisch plane Boden der Zählkammer ist mit einem rechtwinkligen Zählnetz versehen, das aus mehreren Linien mit definierten Abständen besteht. Durch Aufbringen eines optisch plan geschliffenen Deckglases wird über der Bodenfläche ein Raum abgegrenzt, in dem die Zellen mikroskopisch ausgezählt werden können.

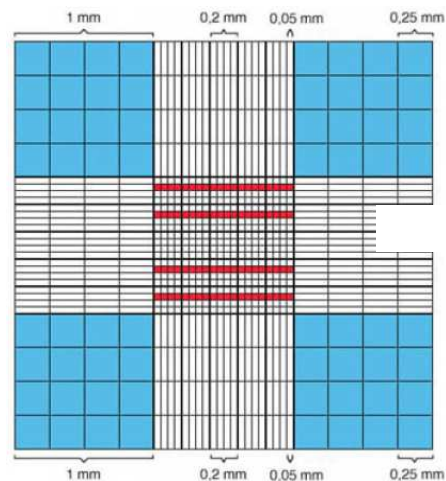


Abbildung 4 Schematische Darstellung einer Neubauer Zählkammer

Die Neubauer Zählkammer hat in der Mitte ein Kreuz aus engen Linien. Die vier Eckfelder (Gruppenquadrate) sind in je 16 Einzelquadrate unterteilt. Das Zählnetz setzt sich aus neun 1x1 mm messenden großen Quadraten zusammen. Von diesen Quadraten enthält das zentrale Quadrat 25 mittlere Quadrate von 0,2 x 0,2mm Seitenlänge, welche wiederum in 16 kleine Quadrate aufgeteilt sind, die aber in erster Linie nur der Erythrozytenzählung dienen. Die markierten großen 4 Eckquadrate dienen der Leukozyten- oder Zellzählung.

Während vitale Zellen in der Lage sind, Trypanblau auszuschließen und im mikroskopischen Bild hell erscheinen, nehmen tote Zellen aufgrund der Membrandurchlässigkeit den Farbstoff auf und zeigen sich tiefblau gefärbt. Nicht vitale Zellen wurden von der Zählung ausgeschlossen.

3.1.5 Zellzählung mittels Neubauerzählkammer

Von der zu zählenden homogenen Zellsuspension wurden 20µl in ein 0,5ml Eppendorf Tube für die Zellzählung pipettiert und anschließend 1:1 mit Trypanblau gemischt. Um die Neubauerzählkammer für ihre Nutzung vorzubereiten, mussten die zum Befestigen des Deckglases vorgesehenen, plan geschliffenen Glasflächen der Kammer leicht ange-

haucht und das geschliffene Deckglas möglichst parallel von der Seite her aufgeschoben werden, sodass auf beiden seitlichen Flächen NEWTON'sche Ringe sichtbar wurden. Dadurch wurde gewährleistet, dass sich das Deckglas in reproduzierbarem Abstand vom Boden der Kammer befand. Ein kleines Volumen (ca. 10 µl) wurde mit einer Pipette auf die Zählkammer am Rand zwischen Deckglas und Kammer gegeben, welches dann über Kapillarkwirkung in die Zählkammer gesaugt wurde. Zellen wurden von links nach rechts, Reihe für Reihe, ausgezählt. Dabei war darauf zu achten, dass nur Zellen, welche auf der unteren und linken Grenzlinie lagen bzw. diese noch berührten mitgezählt wurden, wohingegen Zellen auf der oberen oder rechten Grenzlinie nicht mitzuzählen waren.

3.1.6 Berechnung der Zellkonzentration

Die Zellkonzentration ergibt sich aus der Multiplikation von Zellzahl, Verdünnungsfaktor und Kammerfaktor, der sich aus dem Abstand von 0,1 mm (Kammertiefe) und dem Volumen zwischen Zählnetz und Deckglas berechnet. Das Volumen, das somit über den Quadraten des Zählnetzes liegt, entspricht bei einem großen Eckquadrat 0,1 µl.

3.2 Histologie

3.2.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Die nach Versuchsende histologisch zu untersuchenden Nieren wurden in Einbettkassetten von Rotilabo (*Carl Roth GmbH, Karlsruhe*) eingebettet und über Nacht in 4%/10%iger Formaldehydlösung fixiert. Am nächsten Tag erfolgte eine einstündige Wässerung der Proben unter fließendem Leitungswasser. Zur Paraffinierung des Gewebes unterliefen die Proben in einem Einbettautomaten (*Leica TP 1020, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland*) bei konstanten 60°C aufsteigende Alkoholreihen von dreimal 70%, zweimal 96%, dreimal 100%igem Ethanol, sowie zweimalig Xylol und Paraffin.

Das paraffinierte Gewebe wurde direkt vom Einbettautomat in das 60°C vortemperierte Paraffinbecken der Paraffinausgießstation (*Tissue-Tek TEC, Satura, Torrance, USA*) überführt. Dort erfolgte die Einbettung der paraffinierten Nieren in Paraffinblöcke. Die so entstandenen Paraffinblöcke wurden mittels eines Schlittenmikrotoms (*Microm HM400, Mikrom International GmbH, Walldorf, Deutschland*) in drei µm dicke Schnitte geschnitten und auf einen Objektträger überführt. Diese wurden über Nacht in einem 37°C temperierten Wärmeschrank getrocknet.

3.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur histologischen Auswertung erfolgte die Färbung der Paraffinschnitte mittels Hämatoxylin/Eosin nach folgendem Färbeprotokoll:

1. Deparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte
 1. 2 x 15min Xylol
 2. 2 x 5min Abs. Ethanol
 3. 2 x 5min 96% Ethanol
 4. 2 x 5min 70% Ethanol
 5. 1 x 5min Aqua dest.
2. Progressive Färbung
 1. Kurz in Leitungswasser spülen
 2. Hämalaun: 4min
 3. In Leitungswasser kurz schwenken
 4. In neue Küvette mit Leitungswasser stellen und mind. 10min unter laufendem Leitungswasser bläuen
3. Regressive Färbung
 1. Kurz in Aqua dest spülen
 2. Eosin: 4min
4. Dehydrierung
 1. 80% Ethanol sehr kurz spülen
 2. 96% Ethanol sehr kurz spülen
 3. 100% Ethanol kurz spülen
 4. Xylol 2 x 5min
5. Eindeckeln
 1. Noch feuchte Schnitte mit Eukitt bedecken und mit geeignetem Deckgläschen blasenfrei abdecken
 2. Bei Raumtemperatur eine Stunde trocknen lassen
 3. Lagerung bei Raumtemperatur unbegrenzt

3.3 *In Vivo* Experimente

3.3.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau des Renalen-Ischämie-Reperfusions-Modells setzt sich folgendermaßen zusammen (Abb. 5):

- An drei Terminen 99mTc-MAG3-Nieren-Szintigraphie in Kooperation mit der Nuklearmedizin Großhadern, München bestehend aus
 - einem Baselinescan 4 Tage präoperativ,
 - einem Scan an Tag 2 postoperativ
 - einem Scan an Tag 18 postoperativ
- Renale-Ischämie-Reperfusions-Operation an Tag 0
- Therapeutische Intervention 24 Stunden postoperativ
- Renale-Perfusions-Messung, Gewebeexplantation für Histologie an Tag 21 postoperativ

Es wurden folgende Gruppen gebildet:

- 10 Balb/c Nunu Mäuse mit 45-minütiger unilateraler Ischämie rechts
- 10 Balb/c Nunu Mäuse mit 45-minütiger unilateraler Ischämie rechts und i.v. Applikation von 1×10^6 hMSC 24 h postoperativ
- 10 Balb/c Nunu Mäuse mit 45-minütiger unilateraler Ischämie rechts, intraoperative Dekompressionstherapie und i.v. Applikation von 1×10^6 hMSC 24h postoperativ
- 10 Balb/c Nunu Mäuse mit 45-minütiger unilateraler Ischämie rechts und intraoperativer Dekompressionstherapie

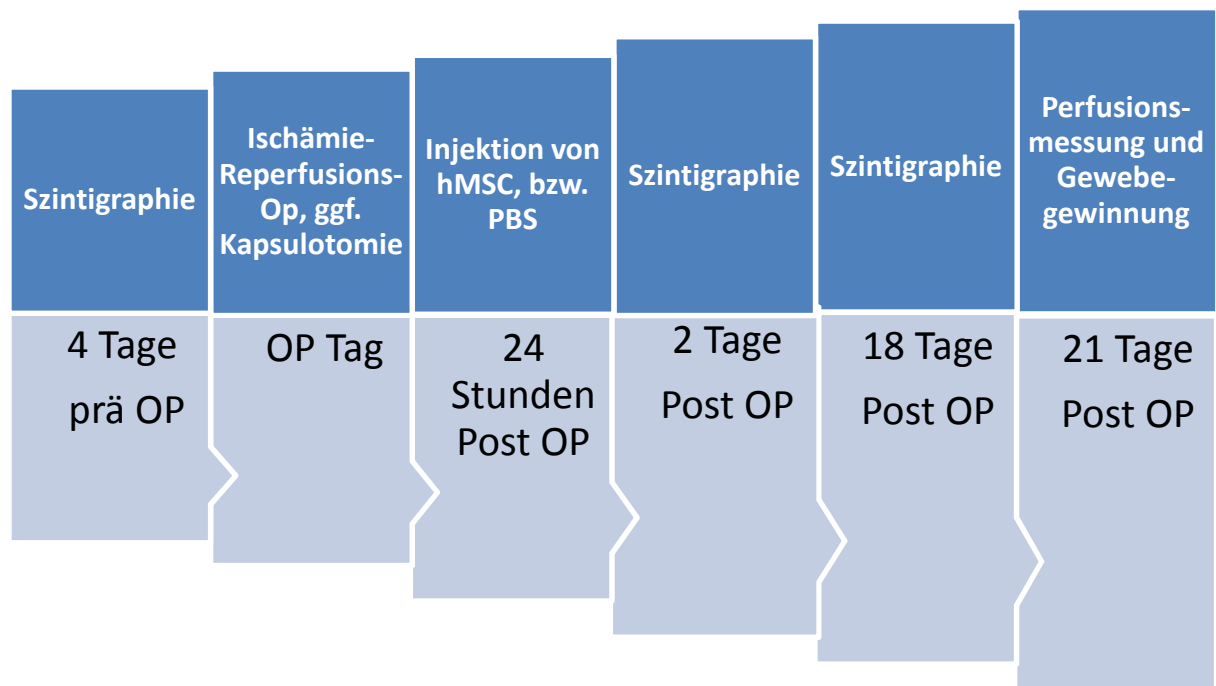


Abbildung 5 schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

3.3.2 Verwendete Tiere

Für diese Versuche wurden Mäuse vom Typ Balb/c nu/nu verwendet, Charles-River-Laboratories (Sulzfeld, Deutschland). Bei Balb/c nu/nu Mäusen handelt es sich um genetisch veränderte Mäuse (Foxn1-Gen) ohne Thymus, die keine funktionsfähigen T-Zellen bilden können und daher immuninkompetent sind. Dies ermöglicht die xenogene Applikation von hMSC, ohne dass es zu einer Abstoßungsreaktion der humanen Zellen kommt. Die Mäuse wogen zwischen 19-23g, waren zwischen 8 und 10 Wochen alt, bekamen Standard-Trockenfutter und erhielten freien Zugang zu Wasser. Während des Versuches standen alle Tiere unter tierpflegerischer und tierärztlicher Überwachung. Alle Tierversuche wurden gemäß den aktuellen Leitlinien und nach Bewilligung durch die bayrische Landesregierung Oberbayern durchgeführt (Tierversuchsanträge: TV 148-10, TV 92-05).

3.3.3 Narkose

Die Narkose erfolgte mit einer Kombination aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl (MMF). Zur Antagonisierung wurde Atipamezol, Flumazenil und Naloxon (AFN) verwendet. Für die Narkose wurden der Maus 50µl MMF intraperitoneal injiziert. Zur Antagonisierung nach der OP bzw. Untersuchung wurden 180µl AFN subkutan appliziert. Die verwendeten Konzentrationen sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Soll (mg/kg) KG	Medikamente	Konzentration	Pro Maus(20g)	Pro Maus(20g)
Medetomidin (α_2 -Adrenorezeptor-Agonist) (Pfizer, Berlin, Deutschland)	0,5mg/kg	1mg/ml	0,01mg	10µl
Midazolam (Benzodiazepin) (Ratiopharm, Ulm, Deutschland)	5mg/kg	5mg/ml	0,1mg	20µl
Fentanyl (Opiat) (Pfizer)	0,05mg/kg	0,05mg/ml	0,001mg	20µl
Atipamezol (α_2 -Adrenorezeptor-Antagonist) (Pfizer)	2,5mg/kg	5mg/ml	0,001mg	20µl
Flumazenil (Benzodiazepin-Antagonist) (Delta Select, Pfullingen, Deutschland)	0,5mg/kg	0,1mg/ml	0,01mg	100µl
Naloxon (Opioid-Antagonist) (Inresa, Bartenheim, Frankreich)	1,2mg/kg	0,4mg/ml	0,024mg	60µl

Abbildung 6 Narkosemittel und deren Dosierung

3.3.4 Nierenfunktionsbestimmung mittels ^{99m}Tc -MAG3-Szintigraphie

Die Nierenfunktion wurde unter Einsatz der radioaktiven Substanz Technetium- ^{99m}Tc -Mercaptoacetyltriglycin (^{99m}Tc -MAG3) szintigraphisch bestimmt. Da ^{99m}Tc -MAG3 (*Technescan MAG3, Covidien, Neustadt/Donau, Deutschland*) aktiv über die Nierentubuli ausgeschieden wird war es möglich die Ausscheidungsfunktion der Nieren seitengenrennt zu ermitteln. (4) Technetium- 99m emittiert γ -Strahlen mit einer Energie von 140keV und besitzt eine Halbwertszeit von sechs Stunden. Die Ganzkörperszintigraphie der Mäuse erfolgte durch eine dreiköpfige Gammakamera (*Philips Prism 3000XP, Celveland, OH, USA*), unter Verwendung des dynamischen Bildprotokolls für ^{99m}Tc -MAG3. Jeder Detektor war mit einem LEHR-Kollimator ausgestattet, wobei nur einer davon für die Ganzkörperszintigraphie der Mäuse genutzt wurde. Hierzu wurden jeweils zwei Mäuse mit einer Injektion von 50 μl MMF intraperitoneal anästhesiert und um eine spätere Ausscheidung des ^{99m}Tc -MAG3 zu verbessern mit einer intraperitonealer Injektion von 200 μl NaCl hydriert. Jeweils zwei anästhesierte Mäuse wurden gleichzeitig, mit gespreizten Extremitäten und in Bauchlage, zentral auf dem Detektor mittels Klebestreifen fixiert. Gleichzeitig mit dem Starten des Imaging Programmes wurde jeder Maus mittels einer Tuberkulinspritze mit aufgesetzter 30 Gauge-Kanüle (*Braun, Deutschland*) durch i.v. Injektion, eine standardisierte Menge des ^{99m}Tc -MAG3 von ca. 3.7×10^7 Becquerel verabreicht. Pro Messung wurden 144 Frames aufgezeichnet, welche alle fünf Sekunden und mit vierfacher Vergrößerung aufgenommen wurden. [43] Nach Beendigung der Messung erfolgte die Antagonisierung der Narkose mittels subkutaner Applikation von 180 μl AFN. Bis zum vollständigen Erwachen verblieben die Mäuse auf der Wärmematte. Um die Funktion der gesunden Nieren zu erfassen, erfolgte die erste Nierenszintigraphie vier Tage präoperativ. Als frühestmöglicher Zeitpunkt zur szintigraphischen Erfassung der akuten Nierenschädigung wurde der zweite postoperative Tag gewählt, um den Stress, dem die Tiere durch den Eingriff ausgesetzt waren, zu minimieren. Für die Messung der Langzeitfunktion der Nieren wurde Tag 18 gewählt.

3.3.5 Bildanalyse

Die Bilddateien wurden mit Hermes kidney analysis software 4.1 (*Hermes Medical Solution, Stockholm, Schweden*), durch standardisierte, manuelle Festlegung der ‚region of interest‘ (ROI) ausgewertet. Hierzu wurden ROIs des Gesamtkörpers, beider Nieren und deren Hintergrundregion, der Leber, der Blase, sowie der Injektionsstelle festgelegt.

Die dadurch erhobenen Daten wurden zu Microsoft Excel exportiert, um die Nierenfunktion als prozentualen Anteil der Injektionsdosis (%ID) darzustellen. Die Werte der Nierenfunktionskurven erhielt man, indem man die Hintergrund-korrigierten Nieren-ROI-Werte durch die Hintergrund-korrigierten Injektionsstellen-ROI-Werte dividierte. Aus den Szintigraphiedaten wurde die fractional uptake rate (FUR) als Maß für die renale Clearance errechnet.

3.3.6 Murines Nierenischämie-Reperusionsmodell

Pro Maus wurde eine Kompresse mit NaCl 0,9% befeuchtet und zusammen mit sterilen Wattestäbchen und autoklaviertem Operations-Besteck bereitgelegt. Um eine konstante Körpertemperatur gewährleisten zu können, wurden die Tiere während der Operation und in der postoperativen Phase auf Wärmematten gelagert. Die Anästhesie der Mäuse erfolgte durch eine intraperitoneale Applikation von 50µl MMF. Nachdem der Fußreflex erloschen war, wurden die Mäuse mit gespreizten Extremitäten und in Rückenlage auf einer Wärmeplatte mittels vier Klebestreifen fixiert. Nach Desinfektion wurde die Haut im unteren Drittel des Abdomens angehoben und mit einer spitzen Schere vorsichtig inzidiert. Die Trennung der Haut von der Bauchmuskulatur wurde durch stumpfe Präparation mittels einer Schere durchgeführt. Anschließend erfolgte durch mediane Schnittführung die Eröffnung des Abdomens entlang der Linea Alba. Mit zwei sterilen Wattestäbchen wurde vorsichtig der Darm nach außen auf eine angefeuchtete Kompresse verlagert, ohne Zug auf die Mesenterialgefäße zu erzeugen. Der Darm wurde mit der feuchten Kompresse eingeschlagen, um eine Austrocknung zu verhindern. Die Haut und Muskulatur des rechten Unterbauches wurden mittels eines kleinen Plastikhakens nach außen verlagert, um einen guten Blick auf das Operationsfeld der rechten Nieren zu ermöglichen. Dann erfolgte die Einstellung des Mikroskops (*STEMI DV4, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland*) auf das ausgeleuchtete Operationsfeld. Mit einer spitzen geraden und einer spitzen, gebogenen Pinzette erfolgte die Präparation des kaudal der A. und V. renalis gelegenen Fettgewebes soweit, bis ein Einführen der Mikroaneurysmaklemme (*Yasargil Aneurysmaclip System, Braun, Melsungen, Deutschland*) über die A. und V. renalis möglich war. Bei den Dekompressionsgruppen erfolgte nun eine zirkuläre Inzision der rechten Nierenkapsel am unteren Nierenpol. Dazu wurde mit der mikrochirurgischen Pinzette die Nierenkapsel vorsichtig angehoben und mit einer 30 Gauge-Kanüle perforiert ohne das darunterliegende Nierengewebe zu beschädigen. Die Mikroaneurysmaklemme wurde von kaudal kommend so an der A. und V. renalis platziert, dass weder die

Niere selbst noch die V. cava mit eingeklemmt wurden. Um sicherzugehen, dass die Klemme richtig platziert worden war, war darauf zu achten, dass beide Spitzen der Klemme kranial der Niere zu sehen waren. Nach dem Abklemmen war ein Abblassen der Niere zu beobachten. Anschließend wurde das Darmpaket vorsichtig reponiert; 200 µl NaCl 0,9% wurden in die Bauchhöhle gegeben, um einen Flüssigkeitsverlust durch die geöffnete Bauchdecke auszugleichen. Mit der angefeuchteten Kompresse wurde nun das Abdomen abgedeckt, um während der Ischämiezeit einen weiteren Flüssigkeitsverlust zu minimieren. Während der Ischämiezeit erfolgte eine regelmäßige Kontrolle der Vitalfunktionen und der Narkosetiefe. Nach der Ischämiezeit von 45 min wurde die Mikroaneurysmaklemme entfernt. Das Peritoneum wurde mit einem 5-0 Prolene Faden (*Ethicon, Livingston, Schottland*) in fortlaufender Nahttechnik verschlossen. Anschließend wurde die Haut mit drei bis vier Klammern (*Hugo Sachs GmbH, March, Deutschland*) verschlossen. Die Antagonisierung der Narkose erfolgte durch subkutane Gabe von 180 µl AFN. Ein subkutanes Depot von 300 µl NaCl/Glukose (Mischverhältnis NaCl 0,9% zu Glukose 5% betrug 1:1) diente dazu postoperativen Hypoglykämien und Hypotonien entgegenzuwirken. Die Mäuse verblieben bis zum vollständigen Erwachen auf der Wärmematte.

3.3.7 Intervention

24 Stunden postoperativ erfolgte eine Isoflurannarkose der Mäuse. In den Kontrollgruppen wurden den Mäusen 100 µl PBS i.v. appliziert. In den Zelltherapiegruppen erhielten die Versuchstiere 1×10^6 hMSCs suspendiert in 100 µl PBS i.v. Die Injektion erfolgte mittels einer 30 Gauge Kanüle.

3.3.8 Renale- Perfusionsmessung

Die renale Perfusionsmessung sowie die Gewebegewinnung beider Nieren für die Histologie fanden nach Abklingen des radioaktiven ^{99m}Tc -MAG3 statt. Hierzu wurden die Mäuse mit 50 µl MMF narkotisiert. Nach Eröffnung des Abdomens mit zwei sterilen Wattetupfern erfolgte die Auslagerung des Darmes, um beide Nieren freizulegen. Die Perfusions-Messung wurde mit der LFM-2-Mikro-Sonde des CO_2 Laser Doppler (*blood flow analyzers O2C, Lea Medizintechnik, Gießen*) durchgeführt. Die Gewebepenetration des Lasers betrug 2mm. Die Sonde wurde sanft gegen den lateralen Teil, sowohl der ischämisch geschädigten rechten Niere, als auch der gesunden linken Niere gehalten bis sich ein konstanter Durchblutungsmesswert einstellte. Die relative Perfusion errechnete sich

aus dem Quotienten von geschädigter zu gesunder Niere. Anschließend erfolgte die Entnahme beider Nieren zur weiteren histologischen Begutachtung.

3.3.9 Subkapsuläre Druckmessung

Die subkapsuläre Druckmessung erfolgte in Kooperation mit der neurochirurgischen Forschungsabteilung Großhadern, München. Zuerst erfolgte eine Ischämie-Reperusions-Operation mit sowohl 35 minütiger, wie auch 45 minütiger Ischämiezeit nach dem oben beschriebenen Verfahren. Anschließend wurde bei jeweils fünf Balb/c nu/nu Mäusen pro Versuchsgruppe der subkapsuläre Nierendruck nach 6, 12, 24 und 48 Stunden, sowie nach 18 Tagen ermittelt. Hierfür wurden die Mäuse mit intraperitonealer Injektion von Ketamin (150 mg/kg) und Xylazin (15mg/kg) narkotisiert und auf dem Rücken liegend auf einer Wärmeplatte fixiert, um einen Abfall der Körpertemperatur zu verhindern. Der abdominale Zugang erfolgte durch Eröffnung der Nähte des bei der vorhergegangenen Operation verwendeten medialen Zugangsweges. Nach Freilegen der rechten Niere wurde durch eine Mikroinzision die Nierenkapsel am rechten, unteren Nierenpol leicht inzidiert, um das Einführen einer ICP-Sonde zu ermöglichen (*Codman ICP microsensor Johnson & Johnson Medical Limited, Berkshire, UK*) Diese wurde 2mm unter der Nierenkapsel eingeführt ohne umgebendes Nierengewebe zu verletzen. Daraufhin erfolgte eine kontinuierliche Druckmessung des intrakapsulären Druckes für 10 Minuten. Danach wurde die Sonde entfernt und die ischämisch geschädigte rechte Niere für eine histologische Begutachtung entnommen.

3.4 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte in Kooperation mit dem Institut für klinische Nuklearmedizin der LMU München mittels SPSS 16.0 (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*) für Windows®. Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest. Statistische Untersuchungen auf Signifikanz erfolgten mittels einer Analyse der Varianz für Messwiederholungen (ANOVA). Die post-hoc Mehrfachvergleiche erfolgten nach Bonferroni, wobei p-Werte < 0,05 als statistisch signifikant gewertet wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Subkapsuläre Druckmessung

Ischämie-Reperfusion der Niere führte zu einer deutlichen Drucksteigerung innerhalb der Nierenkapsel. Das Ausmaß der Drucksteigerung war sowohl von der Ischämiezeit, wie auch vom zeitlichen Abstand zum erlittenen Schaden abhängig. Längere Ischämiezeiten waren mit einer höheren Druckentwicklung vergesellschaftet. Eine Ischämiezeit von 45 Minuten, führte zu signifikant höheren Druckwerten, 6 und 12 Stunden nach Reperfusion als eine mildere Ischämiezeit von nur 35 Minuten ($p < 0,05$). Verglichen mit den subkapsulären Druckwerten von nicht geschädigten Mäusenieren (0.9 ± 0.3 mmHg; $n=5$) zeigte sich bei den Nieren mit 45 minütiger Ischämiezeit eine 7.6-fache Erhöhung der Druckwerte 6 Stunden nach Reperfusion (7.0 ± 1.0 mmHg; $p < 0.001$; $n=5$). Dagegen war der subkapsuläre Druck bei 35 minütiger Ischämiezeit nur 3,6-fach erhöht. (3.3 ± 0.0 mmHg; $p < 0.01$; $n=5$). Während bei 35 minütiger Ischämiezeit schon 24 h nach Reperfusion kein signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe nachzuweisen war (2.2 ± 0.5 mmHg; n.s. vs. Kontrollgruppe; $n=4$), zeigten sich nach 45 minütiger Ischämiezeit auch 24 Stunden nach Reperfusion weiterhin unphysiologisch erhöhte Druckwerte. Nach 48 Stunden Reperfusion wies auch die Versuchsgruppe mit 45 minütiger Ischämiezeit eine Abnahme der Druckwerte auf, welche allerdings bei der Messung 18 Tage nach Reperfusion erneut signifikant anstieg (4.7 ± 1.5 mmHg; $P < 0.05$; $n=5$). [43]

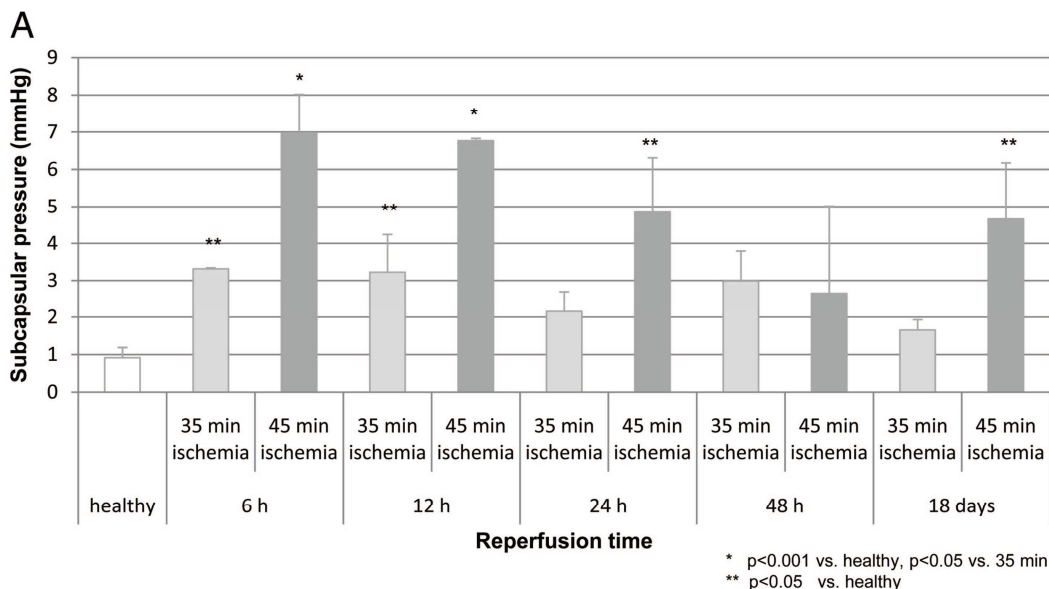


Abbildung 7 Subkapsulärer Druck nach Ischämie-Reperfusion [43]

4.2 Nierenfunktionskurven und Nierenfunktionsanalyse

Ischämie-Reperfusion führt an der Niere zu dauerhaften Schäden des Nierenparenchyms und vermindert die tubuläre Ausscheidungsfunktion. Die mittels des radioaktiven Tracer ^{99m}Tc -MAG3 erstellten Nierenfunktionskurven wurden bezüglich der tubulären Ausscheidungsrate analysiert. Der Analysezeitraum betrug pro Versuchstier jeweils 10 Minuten. Nach 45 minütiger Ischämie zeigte sich szintigraphisch schon am zweiten postoperativen Tag eine Verschlechterung der tubulären Ausscheidungsrate, welche sich auch nach 18 Tagen im Vergleich zum Ausgangswert nicht wieder erholte. (Abb.8) An Tag 2 war bei allen Gruppen eine deutliche Abnahme der tubulären Ausscheidungsrate festzustellen. Die Versuchsgruppe mit reiner Ischämiezeit von 45 Minuten ohne Therapie mit Vehikel wies an Tag 2 eine Reduktion der tubulären Ausscheidungsrate auf Werte von 66,8% ($\pm 9,6\%$) ihres Ausgangsniveaus auf. Die Ausscheidungsrate der mit MSC therapierten Versuchsgruppe halbierte sich fast auf 55,1% ($\pm 11,6\%$) ihres Ausgangsniveaus. Die alleinige Therapie mit Mikrokapsulotomie führte an Tag 2 zu einer Reduktion auf 41,3% ($\pm 6,6\%$), die Therapie mit MSC in Kombination mit Mikrokapsulotomie auf 47,7% ($\pm 5,2\%$) der Ausgangswerte. Der Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander an Tag 2 bezüglich der tubulären Ausscheidungsrate ergab statistisch keinen signifikanten Unterschied. An Tag 18 nach Ischämie-Reperfusion zeigte sowohl die Kontrollgruppe 45,9% ($\pm 6,4\%$), sowie auch die Versuchsreihe mit alleiniger MSC Therapie 23,4% ($\pm 2,8\%$) eine weitere Verschlechterung der tubulären Ausscheidung. Durch alleinige Therapie mit Mikrokapsulotomie stieg die tubuläre Ausscheidung an Tag 18 auf 80,7% ($\pm 10,2\%$) und bei kombinierter Therapie mit MSC und Mikrokapsulotomie auf 54,9% ($\pm 5,1\%$) des Ausgangswertes, jedoch in beiden Fällen waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant.

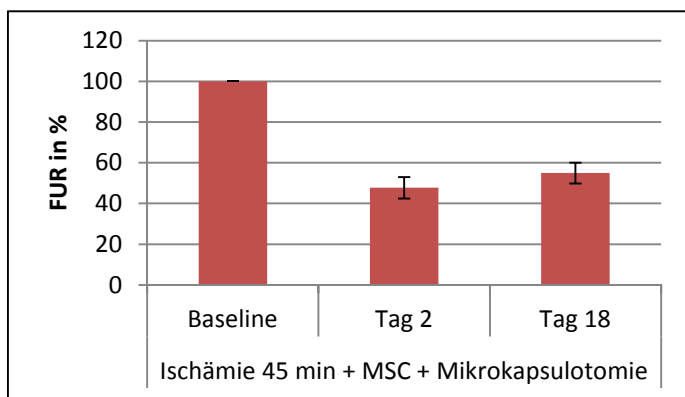
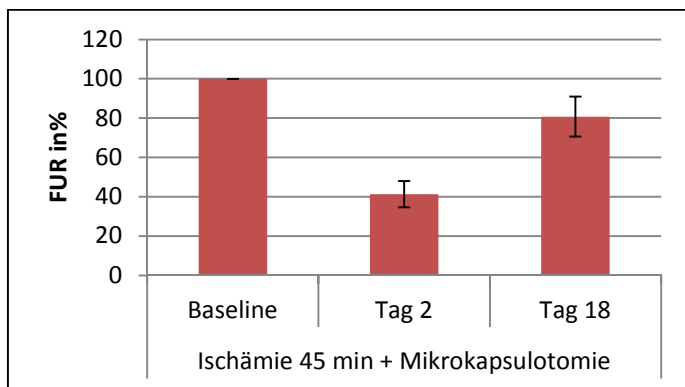
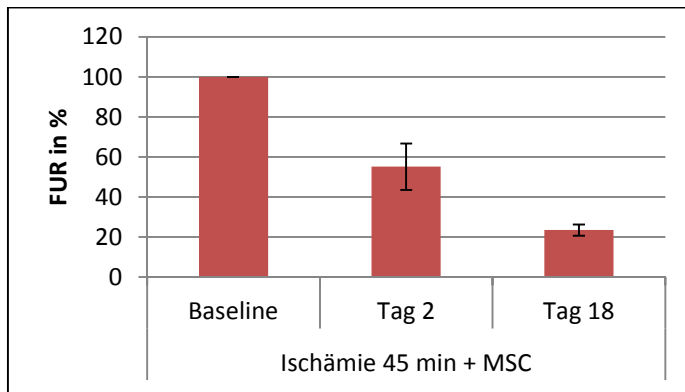
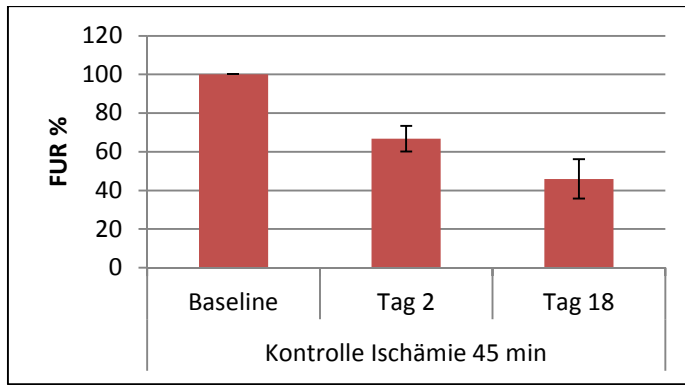


Abbildung 8 Clearance-Werte(FUR) in prozentualer Darstellung zum Ausgangswert

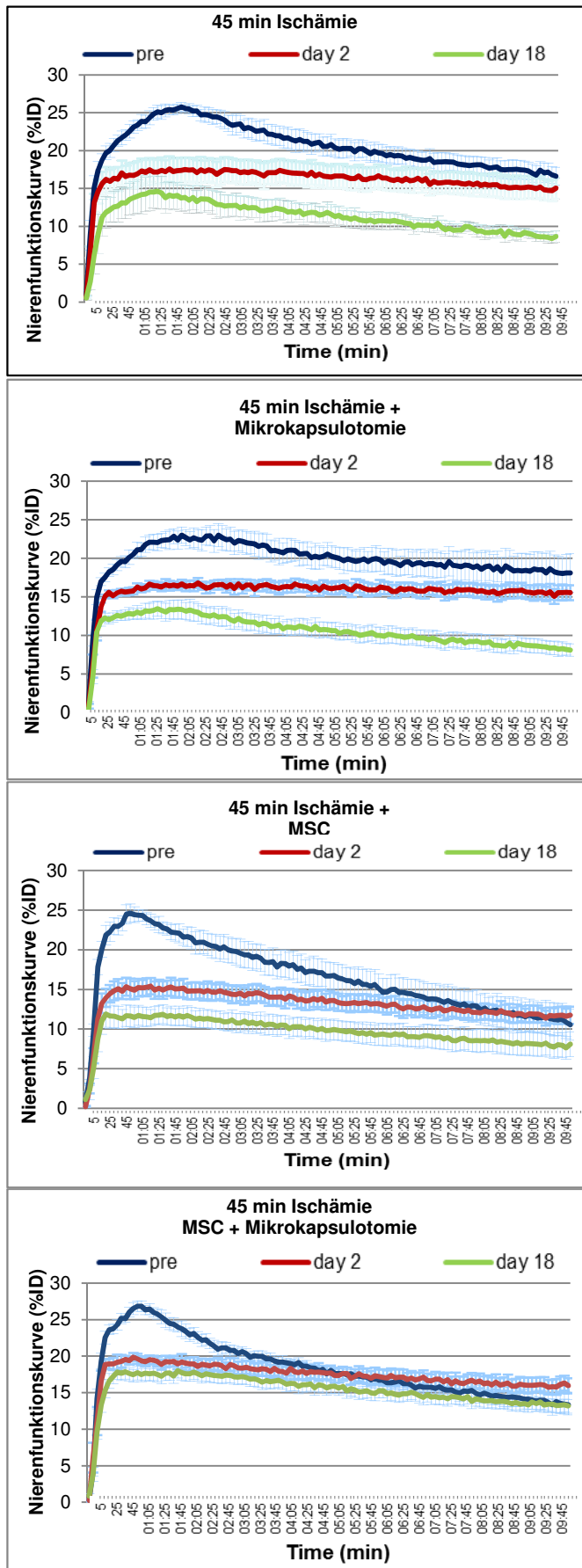


Abbildung 9 Nierenfunktionskurven in prozentualer Darstellung zur Injektionsdosis

4.3 Laser-Doppler-Perfusionsmessung

Ischämie-Reperfusion führt zu einer deutlichen Verschlechterung der Perfusion des betroffenen Gewebes. Ischämische Nieren der Kontrollgruppe zeigten nach 45 minütiger Ischämie ein Perfusionsdefizit von 67,7% ($\pm 2,6\%$) des Ausgangswertes. Bei der reinen Mikrokapsulotomiegruppe waren 82,3% ($\pm 3,2\%$) der ursprünglichen Perfusion erhalten. Eine alleinige Therapie mit MSC wies nach 21 Tagen 80,6% ($\pm 2,3\%$) der ursprünglichen Perfusion auf und die Kombinationstherapie von Mikrokapsulotomie und MSC-Therapie erreichte 84,7% ($\pm 3,1\%$) der ursprünglichen Perfusion. In allen Vergleichsgruppen zeigte sich eine tendenzielle Perfusionsverbesserung, jedoch ohne statistische Signifikanz.

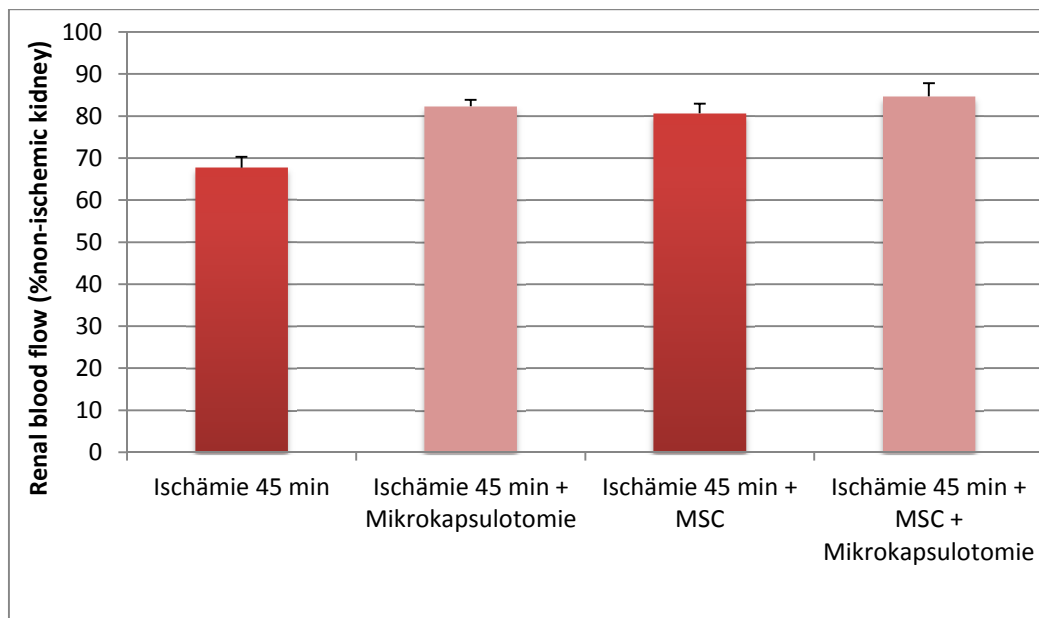


Abbildung 10 Nierenperfusion ischämischer zu kontralateraler nicht ischämischer Niere

4.4 Histologie

4.4.1 Gesunde Niere

Der Schnitt durch gesundes Nierengewebe zeigt ein Bild verschiedener Strukturen. Es finden sich Glomeruli mit einem Durchmesser von 150-250 μm , die durch die umgebende Bowman'sche Kapsel vom restlichen Nierengewebe abgrenzbar sind. Auf manchen Anschnitten einzelner Glomeruli kann man den Gefäßpol gut erkennen, an dem die Vas afferentes in den Glomerulus münden. Dort verzweigen

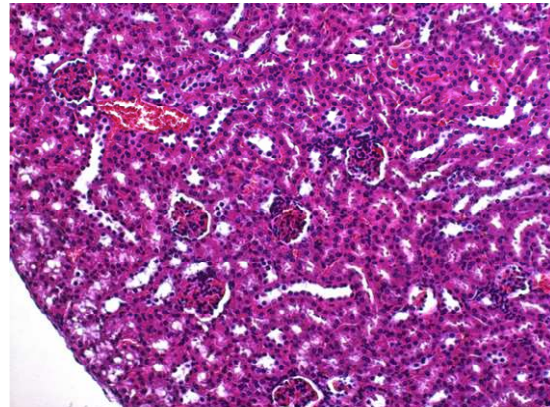


Abbildung 11

Gewebeschnitt durch gesunde Niere HE-Färbung 100x Vergrößerung

sich die Vas afferentes zu einem Gefäßkonvolut, welches für die Ultrafiltration benötigt wird. Dieses vereinigt sich später zu den Vas efferentes und verlässt die Glomeruli wieder am Gefäßpol. Das entstandene Ultrafiltrat verlässt die Glomeruli über den Harnpol, welcher in den proximalen Tubulus mündet. Die proximalen Tubuli stellen sich histologisch als kubische bis hochprismatische Zellen dar. Die Zellgrenzen zwischen den Tubuluszellen sind meist nur unscharf zu erkennen. Zum Lumen hin zeigt sich ein hoher apikaler Bürstensaum. Das Zytoplasma gestaltet sich im Vergleich zum distalen Tubulus stark eosinophil und es zeigt sich eine basale Streifung welche durch einen hohen Anteil an Mitochondrien begründet ist. Der anschließende Tubulus intermedius ist durch sein flaches, organellenarmes Epithel ohne Bürstensaum und ohne basale Streifung charakterisiert. Der distale Tubulus zeigt typischerweise ein kubisches Epithel ohne Bürstensaum. Die Zellgrenzen zeigen sich deutlicher und das Lumen ist weiter als im proximalen Tubulus, der Gesamtdurchmesser erscheint jedoch in der Regel geringer als im proximalen Tubulus. Ähnlich wie bei proximalen Tubuluszellen zeigen distale Tubuluszellen ebenfalls eine basale Streifung, welche durch einen hohen Anteil an Mitochondrien begründet ist. [44] Die sich anschließenden Sammelrohre gehören entwickungsgeschichtlich nicht zum Nephron und stellen sich als einschichtiges, hochprismatisches Epithel mit dunkleren Zellkernen und hellem Zytoplasma ohne basale Streifung dar. Ihr Durchmesser schwankt zwischen 40 und 200 μm . Leukozytäre Zellen finden sich nur sehr vereinzelt. Nekrosen, Fibrosierung, Proteinablagerungen sowie Atrophien finden sich nicht.

4.4.2 Ischämie Niere

Nieren, die durch 45 minütige Ischämie mit anschließender Reperfusion ohne nachfolgende Therapie geschädigt wurden zeigten histologisch massive Gewebeschädigung. Diese zeigt histologisch das Bild einer massiven Zellschädigung. Sowohl die proximalen wie auch die distalen Tubuli stellen sich teils stark dilatiert und atrophisch dar. Nekrosen und Ablagerungen von Proteinzyklindern sind genauso zu beobachten, wie die zytoplasmatische De-

generation der Tubuluszellen. Bei genauerer Betrachtung zeigen sich ein Verlust des Bürstensaumes der proximalen Tubuluszellen, sowie eine vermehrte Vakuolisierung. Auffällig gestaltet sich die massive Infiltration von leukozytären Zellen in das geschädigte Gewebe. Diese zeigen sich sowohl diffus im Gewebe verteilt wie auch kumuliert in Leukozytenstraßen. Es stellt sich ein eher basophiles Zellbild dar. Die Glomeruli weisen keine signifikanten Zeichen von Schädigung, insbesondere keine Nekrosen auf.

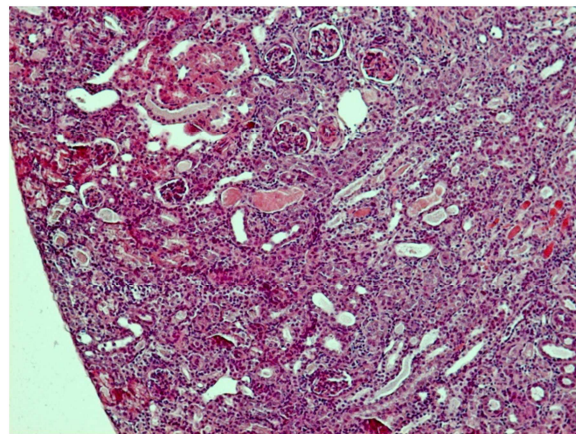


Abbildung 12 Gewebeschnitt Niere mit 45 Minuten Ischämie ohne Therapie HE-Färbung 100x Vergrößerung

Es zeigt sich ein Bild mit vielen Nekrosen, Amyloidablagerungen und leukozytärer Infiltration

4.4.3 Ischämische Niere mit Mikrokapsulotomie

Die HE-Schnitte von Mäusenieren, welche vor der 45 minütigen Ischämie eine Inzisionstherapie der Nierenkapsel erhielten, zeigen histologisch keine relevante Zellschädigung. Außer einer leichten Hyperämie der Glomeruli gestaltet sich das Nierenparenchym regelhaft. Die proximalen Tubuluszellen zeigen ihr physiologisches Bild mit kubischen und teilweise auch hochprismatischen Zellen mit apikalem Bürstensaum. Distale Tubuli und Sammelrohre stellen sich weit-

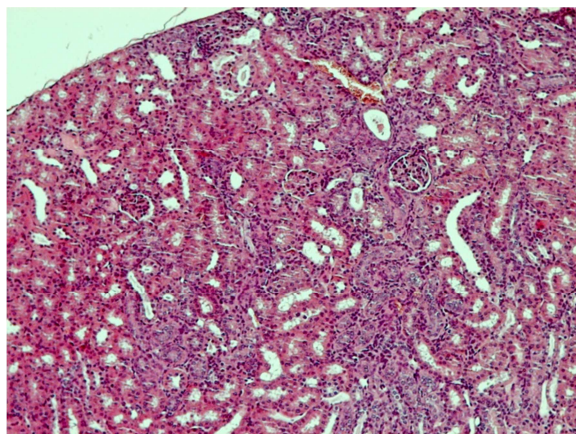


Abbildung 13 Gewebeschnitt Niere mit 45 Minuten Ischämie und Mikrokapsulotomie HE Färbung 100x Vergrößerung

Es zeigt sich eine weitestgehend erhaltene Nierenarchitektur mit deutlicher leukozytärer Infiltration

gehend regelhaft dar. Ablagerungen von Proteinzyklindern oder Fibrosen sind nicht zu

erkennen. Es findet sich eine deutliche leukozytäre Infiltration des Gewebes. Jedoch ist im Gegensatz zu ischämischen Nieren von Mäusen ohne Therapie keine ausgeprägte Akkumulation von leukozytären Zellen zu sehen.

4.4.4 Ischämische Niere unter MSC-Therapie

Bei Betrachtung der histologischen Schnitte der Nieren, welche 24 Stunden nach dem Ischämie-Reperfusionsschaden mit mesenchymalen Stammzellen therapiert wurden fällt auf, dass die Zellschädigungen im Vergleich zu den Gewebeschnitten ohne Vehikel deutlich geringer ausgeprägt sind. So sieht man zwar weiterhin vereinzelte Zellen, die Vakuolen enthalten und mäßig dilatiert wirken, nekrotische Zellen finden sich allerdings nur vereinzelt. Die Glomeruli stellen sich

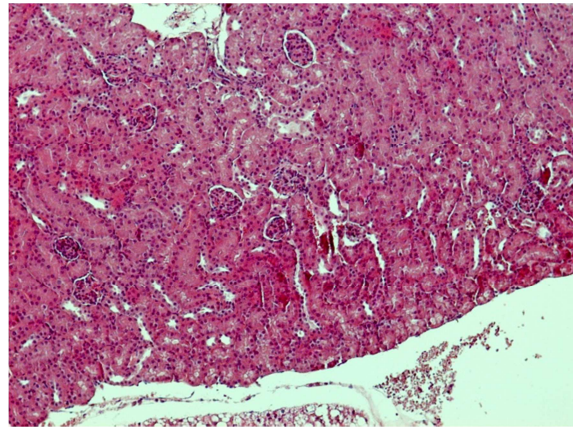


Abbildung 14

Gewebeschnitt Niere mit 45 Minuten Ischämie und anschließender MSC-Therapie HE Färbung 100x Vergrößerung

Es zeigen sich nur wenig nekrotische Areale mit vereinzelten leukozytären Zellen

regelmäßig dar. Die proximalen Tubulzellen zeigen bis auf eine leichte zytoplasmatische Degeneration ihr physiologisches Bild mit kubischen manchmal auch hochprismatischen Zellen mit apikalem Bürstensaum. Distale Tubuli und Sammelrohre stellen sich weitgehend regelmäßig dar. Ablagerungen von Proteinzyllindern oder Fibrosen sind nicht zu erkennen. Es finden sich nur sehr vereinzelt leukozytäre Zellen im Gewebe. Die Glomeruli gestalten sich histologisch regelrecht.

4.4.5 Ischämische Niere mit MSC-Therapie und Mikrokapsulotomie

Die histologischen Nierenschnitte der Mäuse, die intraoperativ eine Mikroinzision der Nierenkapsel und 48 Stunden postoperativ eine Stammzelltherapie mit MSC erhalten haben zeigen im Vergleich zu gesundem Nierengewebe kaum Veränderungen. Die anatomische Architektur ist regelhaft erhalten. Es finden sich keine Dilatationen oder Vakuolen in den Tubuli. Die proximalen Tubuli zeigen sich in kubischer bis hochprismatischen Form mit apikal vorhandenem Bürstensaum. Eine

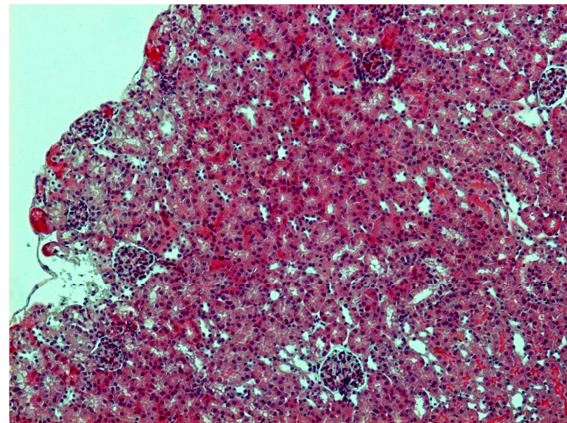


Abbildung 15

Gewebeschnitt Niere mit 45 Minuten Ischämie mit Mikrokapsulotomie und MSC-Therapie HE Färbung 100x Vergrößerung

Es zeigt sich eine gut erhaltene Nierenstruktur mit vereinzelt leukozytären Zellen

zytoplasmatische Degeneration besteht nicht. Es zeigen sich weder nekrotische noch fibrotische Gewebeanteile. Amyloidablagerungen lassen sich nicht nachweisen und leukozytäre Infiltrationen sind nur vereinzelt zu finden. Auch die Glomeruli stellen sich regelhaft dar.

5 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass durch eine Therapie mit hMSC in Kombination mit Mikrokapsulotomie die strukturelle Schädigung der Niere nach Ischämie-Reperfusion deutlich verringert werden konnte. Funktionell konnte eine damit verbundene tendenzielle Verbesserung von renaler Perfusion und Clearance festgestellt werden ohne statistisch signifikanten Unterschied. Auf mögliche Ursachen warum eine Reduktion der Nierenschädigung nicht auch mit einer funktionellen Verbesserung der Nierenfunktion einherging soll nun im nachfolgenden Diskussionsteil genauer eingegangen werden.

5.1 Histologische Auswirkungen der Ischämie-Reperfusion

Die histologische Begutachtung der Schnitte aus der MSC/Mikrokapsulotomiegruppe zeigte eine fast vollständig erhaltene Nierenstruktur ohne Nekrosen oder weiteren auffälligen Parenchymschäden. Im Vergleich zur Mikrokapsulotomiegruppe zeigte sich eine deutlich reduzierte Leukozyteninfiltration des Nierengewebes. Die histologischen Befunde weisen auf günstige Effekte der MSC/Mikrokapsulotomietherapie hin.

Bei Betrachtung der histologischen Schnitte der durch Ischämie-Reperfusion geschädigten Nieren, welche mit intravenöser Gabe von MSC therapiert wurden, zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger morphologische Schäden und deutlich reduzierte inflammatorische Infiltrationen. Der genaue Wirkmechanismus über den MSC ihren renoprotektiven Effekt entfalten, ist noch unklar. Nach heutigem Kenntnisstand wird der Hauptanteil dieses Effekts über parakrine Botenstoffe vermittelt. [45] [46] Es ist schon seit längerem bekannt, dass MSC bei Vorliegen einer Entzündungsreaktion über einen Chemogradienten, welcher über chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) vermittelt wird, zum inflammatorischen Areal gelangen.[39] Wie genau MSC dann am Ort der Gewebsschädigung ihren renoprotektiven Effekt erzielen und ob eine Transdifferenzierung stattfindet, wird hingegen kontrovers diskutiert.[45] Eine Theorie, dass ins Entzündungsgebiet migrierte MSC dort auch apoptotische Endothel- oder Tubuluszellen zu ersetzen vermögen und so zur Nierenregeneration beitragen, konnte lange nicht belegt werden. Es liegen allerdings einige neue Untersuchungsergebnisse zu diesem Themengebiet vor. So konnten Herrera et. al. [47] in einer Studie zeigen, dass MSC sich in

geschädigtem Nierengewebe ansiedeln und zu epithelialen Tubuluszellen ausdifferenzieren können. In dieser Studie wurde C57/BL6 Mäusen eine intramuskuläre Injektion von Glycerol verabreicht, was konsekutiv eine massive Muskelschädigung mit Erhöhung von Myoglobin und Hämoglobin zur Folge hatte. Dieses verursachte ein akutes Nierenversagen mit massiver Tubulusnekrose, welches mittels MSC, aus Knochenmark von green fluorescent protein (GFP) exprimierenden Mäusen gewonnen, therapiert wurde. Die MSC-GFP+ fügten sich nach intravenöser Gabe in geschädigtes Nierengewebe ein und differenzierten sich zu Tubuluszellen weiter, wohingegen sowohl die Integration als auch die Differenzierung der MSC-GFP+ bei gesunden Nieren ausblieb. Auch 21 Tage nach Intervention konnten immer noch GFP+Zellen in den Nieren mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden, was eine Integration und Differenzierung der MSC-GFP+ nahe legt. [47] Die These, dass MSC in geschädigtes Nierengewebe einwandern, dort zu epithelialen Tubuluszellen differenzieren und so die Struktur und Funktion der geschädigten Nieren wiederherstellen wird auch von anderen Autoren gestützt. [48] Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse von Tögel et.al. , dass zwar direkt nach intravenöser Verabreichung von immunfluorezierenden MSC, nach Ischämie-Reperfusion, diese in den Glomeruli nachweisbar waren, allerdings konnten schon nach drei Tagen keine immunfluorezierenden Zellen mehr detektiert werden. [45] Diese Daten stützen auch noch weitere Studien in denen gezeigt wird, dass sich MSC zwar in geschädigten Nephronen ansammeln, sich dort allerdings nur temporär nachweisen lassen und daher eine Integration ins geschädigte Gewebe eher unwahrscheinlich erscheint. [49] [50] Welchen Anteil die zu Tubulus-, Endothel- oder Epithelzellen ausdifferenzierten MSC am therapeutischen Effekt der MSC Behandlung ausmachen ist zurzeit noch nicht ausreichend bekannt. Weiterhin ist nicht noch geklärt, ob Ergebnisse dieser Studien auch auf den Menschen übertragbar sind. Allerdings ist jetzt schon festzuhalten, dass eine Zelltherapie mit MSC schon nach 24 Stunden einen deutlich positiven Effekt auf die Regeneration geschädigten Gewebes zeigt. [45] Zu diesem Zeitpunkt können die transfundierten MSC noch keine apoptotischen Zellen ersetzt und deren Funktion übernommen haben. Daher erscheint es sehr wahrscheinlich, dass zumindest die frühen Wirkungen der MSC Therapie über para- und autokrine Effekte vermittelt werden. Bei der Betrachtung von Ergebnissen verschiedener Forschungsgruppen zum akuten Nierenversagen müssen die jeweiligen Versuchsbedingungen und Versuchsanordnungen berücksichtigt werden, welche untereinander stark differieren. So existieren verschiedene Mo-

delle, um eine Nierentransplantation zu simulieren. Die Nierenschädigung kann beispielsweise durch Ischämie-Reperfusion, durch hohe Werte an Myoglobin/Hämoglobin oder pharmakologisch durch die nephrotoxische Substanz Cysplatin verursacht werden. [45] Weitere Faktoren, die den Vergleich von Studien erschweren, stellen die verwendeten Versuchstiere dar. So werden von manchen Forschungsgruppen Wildtyp-, von anderen verschiedene transgen-veränderte Mäuse oder auch Ratten verwendet. Beim Vergleich der hier gezeigten Daten zum Menschen gilt es deshalb zu erwähnen, dass es sich bei dem hier verwendeten Mäuse-Typ um athymische BalbC/Nunu handelte, die somit auch keine funktionsfähigen T-Zellen produzieren konnten und daher kein komplett funktionierendes Immunsystem vorwiesen. Dies war unbedingt notwendig, um eine sofortige Abstoßung der humanen MSC zu verhindern. Interessanterweise wiesen athymische Balb/c nu/nu Mäuse ausgeprägtere Zellschädigungen nach Ischämie-Reperfusion auf als Mäuse vom Balb/c Wildtyp. Dies wird von aktuellen Studien gestützt, die die pathophysiologische Rolle von B-Zellen und den protektiven Effekt von regulatorischen T-Zellen nach Ischämie-Reperfusion untersucht haben.[51, 52]

Obwohl MSC in der Lage zu sein scheinen sich in geschädigtes Nierengewebe zu integrieren und dort zu Tubuluszellen weiter zu differenzieren, so bewirken jedoch parakrine und/oder autokrine Effekte aller Wahrscheinlichkeit nach den größten Anteil an dem regenerativen Potential der MSC. [46] [53] So konnte gezeigt werden, dass mit MSC behandelte Mäuse 24 Stunden nach erlittenem Ischämie-Reperfusionsschaden eine signifikant erniedrigte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , TNF- α , IFN- γ und induzierbarer Nitroxid-Synthase aufwiesen. Gleichzeitig zeigten sich die anti-inflammatorischen Zytokine wie IL-10, bFGF, TGF- α und Bcl-2 stark hochreguliert. [45] Durch Sezernierung dieser und weiterer Botenstoffe durch die MSC werden die ins inflammatorisch und ischämisch geschädigte Gebiet eingewanderten Immunzellen, wie B- und T-Lymphozyten, wie bereits weiter oben beschrieben, immunmodulatorisch so beeinflusst, dass eine überschießende Entzündungsreaktion abgemildert oder gar verhindert werden kann. Dies wäre auch eine plausible Erklärung dafür, warum in der histologischen Analyse, der mit MSC therapierten Versuchsgruppe, eine deutlich geringere Anzahl an leukozytären Zellen im Nierenparenchym anzutreffen war. Weiterhin sezernieren MSC eine Reihe an bioaktiven Substanzen, wie unter anderem vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatic growth factor, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), bone morphogenetic protein-7 [50] und antiapoptotische Zytokine, die dann

im geschädigten Gebiet freigesetzt werden und benachbarte Zellen beeinflussen [37]. So zeigte sich, dass nach Nierenschädigung und anschließender Behandlung mit MSC die Anzahl an Tubuluszellen, welche proliferating cell nuclear antigen exprimierten, sich im Vergleich zur Kontrollgruppe stark erhöht darstellte.[47] Daraus kann man schließen, dass MSC über parakrine Faktoren die Proliferationsrate von Tubuluszellen steigern können und auf diesem Weg auch zur Regeneration des Nierengewebes beitragen. [53] Ob und wie genau diese Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind, ist abschließend allerdings noch nicht geklärt.

Die Mikrokapsulotomie Gruppe zeigte in der histologischen Analyse bis auf einzelne atrophische Zellen und vermehrte Leukozyteninfiltration eine Verbesserung im histologischen Bild ohne wesentliche strukturelle Schädigung. Über die Ursache warum die Gewebestruktur weitestgehend vor Schäden durch Mikrokapsulotomie geschützt wurde lässt sich zurzeit nur spekulieren. Ein Erklärungsversuch hierfür könnte sein, dass die Mikrokapsulotomie wirkungsvoll als Drainage fungiert und somit intrarenalen Druck und Ödembildung nach Ischämie-Reperfusion effektiv eindämmen kann. Ein geringerer intrarenaler Druck und ein weniger ausgeprägtes Ödem wiederum vermindern möglicherweise den interstitiellen Druck, der auf die Kapillaren wirkt und verbessern hierdurch die Mikrozirkulation. Dadurch könnten Hypoxie verringert und der Abtransport saurer und toxischer Stoffwechselprodukte erleichtert werden. Weiterhin könnte eine Ödemreduktion auch zu verringerter Ödembildung der Tubulus- und Endothelzellen führen, was konsekutiv weniger Fibrosen und Nekrosen zur Folge hätte.

5.2 Auswirkungen von Ischämie-Reperfusion auf die Nierenfunktion

Obwohl das Nierengewebe histomorphologisch in der Mikrokapsulotomie und Mikrokapsulotomie/MSC Versuchsgruppe deutlich weniger Schäden aufwies, zeigte keine der drei Therapiegruppen eine signifikante Erholung der Nierenfunktion nach Ischämie-Reperfusion. Von anderen Autoren wurde beschrieben, dass eine alleinige Gabe von MSC nach Ischämie-Reperfusion effektiv Schäden an der Niere verhindern könne und die Nierenfunktion, gemessen am Serumkreatinin, sich im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verbessere.[49] [45]Während das histologische Bild und die Nierenperfusion in der MSC therapierten Gruppe eine mäßige Verbesserung vorwiesen, stellte sich die Nierenfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verbessert dar. Es

zeigte sich eine deutliche Reduktion der Nierenfunktion 18 Tage nach Ischämie-Reperfusion und veranschaulicht so einen progressiven Funktionsverlust der Niere. Dies lässt sich sehr gut mit anderen Ergebnissen vereinbaren, die gezeigt haben, dass eine alleinige Zelltherapie mit HUVEC in der ischämischen Niere die renalen Clearance-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verbesserte, sondern sogar verschlechterte. [51] Eine mögliche Erklärung für die verschlechterten Clearance-Werte von alleiniger Zelltherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe könnte darin bestehen, dass intravenös applizierte Zellen in den Kapillaren akkumulieren und dort zu Mikrothromben führen. [51] Betrachtet man nun die Clearance-Werte von Mikrokapsulotomie und Mikrokapsulotomie/MSC an Tag 18 nach Ischämie-Reperfusion, so zeigt sich die Tendenz, dass ein weiteres Voranschreiten der Nierenfunktionseinschränkung, wie man es bei alleiniger MSC-Therapie/Kontrollgruppe beobachtet, vermindert werden könnte, jedoch ohne statistische Signifikanz. Dies könnte auf die kleine Fallzahl (n=6) und einem nur gering ausgeprägtem positivem Effekt der Therapie zurückzuführen sein.

Interessanterweise wurde in vorangegangenen Studien eine signifikante Verbesserung der Nierenfunktion durch MSC-Applikation nach Ischämie-Reperfusion nachgewiesen. [45, 46]. Dies könnte darin begründet liegen, dass die Nierenfunktion in vielen Studien mit anderen, weniger sensitiven als den hier verwendeten Messverfahren ermittelt wurde. Weiterhin weisen viele Studien nur einen kurzen Beobachtungszeitraum von wenigen Tagen auf, sodass meist nur auf die kurzfristigen Auswirkungen des Ischämie-Reperfusion-Schadens eingegangen wurde. So ist relativ viel über die kurzzeitigen Auswirkungen des Nieren Ischämie-Reperfusion-Schadens bekannt. Untersuchungen zur Nierenfunktion einige Wochen nach Ischämie-Reperfusion hingegen liegen kaum vor. [46]

Die meisten Forschungsgruppen messen für die Bestimmung der Nierenfunktion die Serum-Harnstoff-Konzentration, die Proteinausscheidung und das Serumkreatinin. [46, 54] Nur in der frühen postischämischen Phase, 24-72 Stunden nach Ischämie, stellen die Serumwerte für Kreatinin einen guten Indikator für renale Dysfunktion dar. Nach dieser Zeit fallen die Serumwerte von Kreatinin und Harnstoff auch ohne Therapie wieder auf ihr Ausgangsniveau zurück und lassen daher keine Rückschlüsse auf Langzeitschäden, Regenerationspotential oder etwaigen Therapieerfolg zu. [54] Dies ist damit zu erklären, dass das Serumkreatinin vollständig glomerulär ultrafiltriert und tubulär nicht rückresorbiert wird. Bei hohen Serumkreatininspiegeln kann es unter Umständen sogar

zu einer tubulären Sekretion von Kreatinin kommen. So steigt das Serumkreatinin hauptsächlich an, wenn Glomeruli selbst geschädigt werden, bei Schädigung proximaler Tubuluszellen, die deutlich empfindlicher auf Hypoxie reagieren und somit schon früher Schädigungen aufweisen als Glomeruli, steigt der Serumkreatininwert hingegen nur in geringem Maße an. [55]

In der vorliegenden Arbeit wurde die Nierenfunktion daher mittels dynamischer Szintigraphie ermittelt. Hierfür wurde den Versuchstieren die radioaktive Substanz Technetium-99m-Mercapto-Acetyl-tri-Glycin (99mTc-MAG3) zur Funktionsanalyse intravenös verabreicht. Aus den hieraus gewonnenen Daten wurde die fractional uptake rate (FUR) errechnet, welche die renale Clearance widerspiegelt. Die hierbei verwendete Rechenoperation stammt aus Erkenntnissen, die aus klinischen Versuchsreihen an Menschen gewonnen wurden. [55]

Dieses Verfahren bietet einige Vorteile, die auch in kürzlich publizierten Studien gezeigt werden konnten. So konnten frühe aber auch späte renale Funktionsveränderungen im Mausmodell nach Ischämie-Reperfusion nachgewiesen werden.[51] Mittels szintigraphischer Nierenfunktionsbestimmung konnten renale Dysfunktionen nachgewiesen werden, die mit den allgemein verwendeten Verfahren nicht zu detektieren waren. [55] Ein weiterer Vorteil der szintigraphischen Nierenfunktionsmessung besteht darin, dass Nierenfunktion und die renale Clearance seitenunabhängig erfasst werden können. Dadurch ist es möglich eine unilaterale ischämische Niere mit der gesunden Gegenseite zu vergleichen und nachzuprüfen, welche Auswirkungen ein Ischämie-Reperfusionsschaden auf die verbliebene gesunde Niere hat.

Dieses Ergebnis legt nahe, dass weder eine Monotherapie mit MSC, noch eine alleinige Therapie durch Mikrokapsulotomie in diesem Setting ausreichend wirksam sind, um eine chronische Nierendysfunktion nach Ischämie-Reperfusion zu verhindern. Auch deren Kombination konnte die Nierenfunktion nicht signifikant verbessern. Diese Ergebnisse bestätigen auch kürzlich veröffentlichten Daten aus denen hervorgeht, dass weder eine alleinige Mikrokapsulotomitherapie noch eine alleinige Zelltherapie mit HUVEC eine signifikant verbesserte Nierenfunktion vorweisen konnten. Eine Kombination dieser beiden Therapien konnte hingegen die Nierenfunktion in beträchtlichem Maße wiederherstellen, so dass im vorliegenden Setting die Anwendung von endothelialen Zellen der MSC-Therapie überlegen war. [51] Weitere Untersuchungen mittels Cell-Tracking sind allerdings erforderlich, um die genauen Wirkungsweisen zu verste-

hen. Allerdings scheint die Lokalisation der Zellansiedlung hierbei eine besondere Rolle zu spielen, da der venöse Anteil der Kapillaren als derjenige Bereich beschrieben wurde, an dem bei Inflammation die meiste Flüssigkeit über Kapillarlecke ins Interstitium übertritt und somit die Bildung von Ödemen begünstigt wird. [51] Die Druckverhältnisse in venösen Kapillaren könnten auch einen weiteren Grund darstellen, warum Individuen, die mit HUVEC behandelt wurden mehr von der Druckentlastungstherapie profitieren als MSC, da ein erhöhter intrarenaler Druck sich zuerst negativ auf diesen Gefäßabschnitt auswirkt. MSC hingegen entfalten ihre renoprotektive Wirkung hauptsächlich über para- und autokrine Effekte und integrieren sich nur vereinzelt in geschädigtes Gewebe. In Anbetracht dessen, dass in diesem Versuchsaufbau MSC nur einmalig verabreicht wurden, ist zu vermuten, dass MSC nur für wenige Tage im Körper persistieren und somit einen geringeren Einfluss auf die Langzeitprognose der Nierenfunktion ausüben könnten als HUVEC, die sich in geschädigtes Endothel integrieren. Dies würde sich auch mit der Erkenntnis decken, dass MSC wiederholt infundiert werden müssen, um in der klinischen Anwendung einen signifikanten positiven Effekt zu erzielen. [41]

5.3 Auswirkungen der Ischämie-Reperfusion auf die Nieren-Perfusion

Sowohl für die MSC- wie auch für die Mikrokapsulotomie- Versuchsgruppe zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine tendenziell verbesserte Perfusion. Perfusionswerte der Kombinationstherapie aus MSC/Mikrokapsulotomie wiesen zwar im Vergleich zur Kontrollgruppe auch eine tendenzielle Verbesserung auf, waren aber statistisch nicht signifikant. Wie genau sich Mikrokapsulotomie und MSC-Zelltherapie gegenseitig beeinflussen, ist bisher noch nicht bekannt und bedarf weiterer Studien. So könnte eine Druckreduktion im Nierenparenchym die Integration von intravenös applizierten Zellen fördern und über diesen Mechanismus zur Regeneration des Gewebes beitragen. Da HUVEC, im Gegensatz zu MSC, die Eigenschaft besitzen neue Gefäße bilden können [56] wäre es möglich, dass durch eine Kombination mit einer Druckentlastungstherapie die Integration von HUVEC in geschädigtes Endothel erleichtert würde und eine deutlichere Verbesserung der Perfusion erzielt wird als durch Therapie mit MSC und Mikrokapsulotomie. Eine elegante Möglichkeit, die Interaktionen von Dekompressions- und Zelltherapie zu untersuchen bestünde in der Markierung der applizierten Zellen z.B.

mittels GFP wie von Herrera et. al. beschrieben. [47] Auf diese Weise könnte geklärt werden, ob sich mit GFP markierte MSC in Kombination mit einer Dekompressionstherapie vermehrt im Nierenparenchym nachweisen lassen. Wäre dies der Fall, so könnten Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob ein geringerer Druck im Nierenparenchym die Integration von venös applizierten Zellen im geschädigten Gewebe erleichtert. Eine weitere Möglichkeit, den Anteil der MSC am Therapieerfolg zu verifizieren, bestünde darin, alle zuvor verabreichten MSC nach einem bestimmten Zeitraum wieder zu eliminieren. Ein Toxin, welches hierfür geeignet zu sein scheint, ist das Diphtherietoxin.[57] Dazu müssten zuerst transgene Mäuse gezüchtet werden, deren Zellen vermehrt den Diphtherie-Toxin-Rezeptor an der Zelloberfläche exprimieren.[57] Aus diesen genetisch veränderten Mäusen könnten MSC isoliert und dann für eine Zelltherapie nach Ischämie-Reperfusion verwendet werden. Hierbei reicht ein einziger Rezeptor an der Zelloberfläche aus, um nach Gabe von Diphtherie-Toxin, die Apoptose der Zelle zu induzieren. Dies hätte zur Folge, dass nach Gabe von Diphtherie-Toxin sehr selektiv die vorher applizierten Zellen eliminiert werden könnten, ohne das übrige Gewebe zu schädigen. [57] Die Veränderungen in Funktion und Histologie würden dann einen direkten Rückschluss auf die Rolle der applizierten MSC erlauben. Um verstehen zu können, ob eine zusätzliche Mikrokapsulotomitherapie die Integration von MSC ins Gewebe fördern kann, kann ein Blick auf das Verteilungsmuster der MSC nach systemischer Applikation hilfreich sein, da man dadurch genauer erfährt in welchen Organen diese sich bevorzugt ansiedeln. Um dieses Verteilungsmuster genauer zu untersuchen kultivierte Tögel et.al. MSC, die mit dem Luciferase/Neomycin Phosphotransferase-Gen transfiziert worden waren. Diese Luc/Neo-MSC konnten so nach Verabreichung von Luciferin durch Biolumineszenz in vivo nachgewiesen werden. Es zeigten sich zwei interessante Effekte: nach arterieller Gabe verteilten sich die Luc/Neo-MSC bei gesunden Mäusen gleichmäßig im Körper, wohingegen Luc/Neo-MSC nach Ischämie-Reperfusion der Niere auch dort vermehrt nachgewiesen werden konnten. Eine intravenöse Applikation hingegen führte zu einer Akkumulation der Luc/Neo-MSC in beiden Lungenflügeln. [58] Eine ausgeprägte Akkumulation von MSC kann in Ischämie und Mikroembolien des Endstromgebietes münden. Mögliche Ursachen, die eine Akkumulation der MSC im Kapillarbett begünstigen, scheinen sowohl mechanischer wie auch biochemischer Natur zu sein. Die mechanische Ursache könnte allein in der Größe der MSC begründet sein, da es sich bei MSC um sehr große Zellen handelt. Für biochemische Ursachen

liefern Erkenntnisse aus in vitro Versuchen Erste Hinweise. So wiesen MSC in vitro ein ähnliches Verhalten wie Leukozyten auf. Sie zeigten ein Gefäßwandrollen, eine Adhäsion am Endothel über P-Selektin und sehr späte Antigen-4/Vascular-Cell-Adhesion-Molecule-1 Interaktionen. Weiterhin wird vermutet, dass MSC die Fähigkeit besitzen, über Sekretion von Matrix-Metalloproteasen die Gefäßwand ähnlich den Leukozyten zu durchwandern. Diese Adhäsionsfähigkeit stellt ein besonderes Problem für die Zelltherapie mit MSC dar. So scheint es, dass einerseits bei i.v. Injektion ein Großteil der infundierten Zellen im Kapillarbett der Lunge akkumulieren und somit nicht in der Lage sind, an ihren Wirkungsort zu gelangen um dort die gewünschte Wirkung zu entfalten. [59] Andererseits führen die an den Zielort gelangten MSC dann möglicherweise durch Adhäsion an der Gefäßwand zu einer verschlechterten Durchblutung und zu Mikroembolien. Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigten jedoch, dass MSC zu einer Durchblutungsverbesserung im Vergleich zur Kontrollgruppe führten, was den Schluss nahe legt, dass die parakrinen, renoprotektiven Effekte der MSC überwiegen. Eine zusätzliche Mikrokapsulotomietherapie konnte allerdings die Durchblutungsverhältnisse im Vergleich zur alleinigen MSC-Therapie nicht maßgeblich verbessern. Inwieweit Mikroembolien durch Mikrokapsulotomietherapie verhindern werden können, ist bisher noch unzureichend geklärt.

Eine lang anhaltende Minderdurchblutung der Niere stellt eine wesentliche Ursache für den Untergang proximaler Tubuluszellen dar, behindert deren Regeneration und fördert schließlich die Entstehung tubulointerstitieller Fibrose. [51, 60] Dies ist bei dem hier verwendeten Ischämie-Reperfusion-Modell von entscheidender Relevanz. So führt nicht nur die Ischämie selbst zu einer unmittelbaren Unterversorgung des Nierengewebes mit Sauerstoff, sondern auch 21 Tage nach stattgehabter Ischämie-Reperfusion zeigten Mäuse aus der Kontrollgruppe erniedrigte Perfusionswerte im Vergleich zu gesunden Individuen. In der histologischen Begutachtung der geschädigten Nieren zeigten diese das Bild einer massiven Zellschädigung mit ausgeprägten Tubulusnekrosen. Im Normalfall sind epitheliale Tubuluszellen nicht sehr anfällig bezüglich Hypoxie, wobei hierbei die Induktion des hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) wahrscheinlich eine zentrale Rolle einnimmt. Klinische und experimentelle Forschung konnten zeigen, dass sowohl epitheliale Tubuluszellen wie auch peritubuläre Endothelzellen eine hohe Regenerationsfähigkeit aufweisen, solange eine ausreichende Perfusion gewährleistet ist. [60] Als Ausgangspunkt der Regeneration von proximalen Tubuluszellen wird heute ange-

nommen, dass überlebende Epithelzellen die Fähigkeit besitzen wieder zu dedifferenzieren und anschließend zu proliferieren. Ein weiterer Ursprungsort für Stammzellen, die für die Neubildung epithelialer Zellen verantwortlich zu sein scheinen konnte im Bereich der Papillen nachgewiesen werden.[61] Um die Perfusion der Niere optimal steuern zu können besitzen Endothelzellen die Fähigkeit auf metabolische und immunologische Signale zu reagieren. Bei Infektion, Ischämie und Inflammation interagieren stimulierte Endothelzellen mit Leukozyten, um ein Anhaften an der Endothelwand und eine anschließende Migration ins geschädigte Gebiet zu erleichtern. Allerdings verengen die an der Gefäßwand anhaftenden Leukozyten das Gefäßlumen in den Kapillaren und reduzieren so den Blutfluss. Da Endothelzellen selbst durch Expression von HIF-2 α gut gegen Hypoxie geschützt sind, führt der konsekutiv reduzierte Blutfluss zuerst zu einer Minderversorgung der Tubuluszellen. Sinkt die Perfusion weiter, so kommt es auch zu einer Unterversorgung der Endothelzellen mit Sauerstoff und die so vermehrt gebildeten Sauerstoffradikale müssen entweder mit enzymatischen oder nicht-enzymatischen Antioxidantien neutralisiert werden. Gelingt dies nicht vollständig kommt es zu Proteinveränderungen und Stress-induzierter Alterung der Zellen. Auch führt eine ständige Stimulierung der peritubulären Endothelzellen zur vorzeitiger Alterung der Zellen, welche dann wieder durch Proliferation benachbarter Zellen oder durch Stammzellen ersetzt werden müssen, um eine Thrombosierung und nachfolgende Schädigung des Nephrons zu verhindern.[60] Um die Entstehung dieser Schäden zu verhindern oder zumindest abzumildern stellt eine Zelltherapie mit Stamm- oder Progenitorzellen eine vielversprechende Möglichkeit dar. So konnte schon gezeigt werden, dass intravenös verabreichte endotheliale Progenitorzellen (EPC) sich in geschädigte Gefäßwände integrieren [62] und über Sezernierung von proangiogenetischen Stoffen, wie VEGF, die Durchblutung nach Ischämie-Reperfusion auch langfristig komplett wiederherstellen können. [63] Dabei scheint es, dass zirkulierende EPC bei der Integration von geschädigten Kapillaren, ortsansässige Progenitorzellen hingegen hauptsächlich für größere Gefäße eine wichtige Rolle spielen. [64] Im Vergleich dazu führten die hier als Monotherapie applizierten MSC nur zu einer moderaten Verbesserung der Perfusion 21 Tage nach Ischämie-Reperfusion. Da sowohl MSC als auch EPC zu einer erhöhten Ausschüttung von VEGF führen, könnte der Unterschied in der Perfusion darin begründet sein, dass MSC sich im Vergleich zu EPC wenn überhaupt nur sehr vereinzelt in das geschädigte Endothel integrieren und somit die Mikrozirkulation lediglich in geringerem Ausmaß wie-

derherstellen können wie EPC. Allerdings können sowohl EPC, wie auch MSC den Untergang von peritubulären Kapillaren verhindern und somit die Perfusion verbessern. [50] Hierbei wird dem VEGF eine wichtige Rolle für eine verbesserte Nierendurchblutung nach Ischämie-Reperfusion zugeschrieben. VEGF stellt einen der wichtigsten pro-angiogenetischen Wachstumsfaktoren dar, welcher innerhalb der Niere von Podozyten und epithelialen Tubuluszellen stetig gebildet wird und so das Überleben und die Regeneration der Endothelzellen sichert. So zeigte sich, dass eine fortschreitende Nierenschädigung konsekutiv auch zu einer Minderepression von VEGF führt, was wiederum eine Abnahme der Dichte von peritubulären Kapillaren und schwere interstitielle Fibrose zur Folge hatte. Bei dem Versuch diesem Geschehen durch externe Gabe von VEGF entgegen zu steuern, gelang es nicht nur die Mikrozirkulation durch Stimulation von Endothelzellen wiederherzustellen, sondern auch intrarenale Fibrose zu vermindern und die Nierenfunktion zu stabilisieren. [65] Weiterhin wird der positive Effekt von VEGF deutlich, wenn man aus menschlichem Nabelschnurblut gewonnen venöse endotheliale Progenitorzellen, kurz HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) die kein VEGF exprimieren mit VEGF exprimierenden endothelialen Progenitorzellen (EPC) vergleicht. So konnte für HUVEC keine Verbesserung der Perfusion 21 Tage nach Ischämie-Reperfusion gezeigt werden [51], wohingegen EPC die Perfusion komplett wiederherstellen konnten. [63] Diese Ergebnisse verdeutlichen die wichtige Rolle des VEGF in der vaskulären Regeneration.

5.4 Auswirkungen der Mikrokapsulotomie auf die Nierenregeneration nach Ischämie-Reperfusion

Ischämie-Reperfusion führt wie bereits weiter oben im Detail beschrieben zu Zellschädigung und Inflammation, was konsekutiv durch endotheliale Schädigung zu interstitieller Ödembildung führt. Da die Niere von einer straffen, fibrotischen Kapsel umgeben ist, geht eine ausgeprägte Ödembildung mit einer Druckerhöhung innerhalb der Niere einher. Daher erschien eine therapeutische Intervention mittels Mikrokapsulotomie sinnvoll. Dieser Annahme folgend wurde die Hypothese eines renalen Kompartment-Syndroms formuliert. Kompartment-Syndrome sind bereits für Extremitäten, den Schädel und das Abdomen beschrieben. Man spricht von einem abdominellen Kompartment-Syndrom, welches durch Traumata, akuten Gefäßverschluss, Aszites, Inflammation o-

der Ischämie/Reperfusion bedingt werden kann, wenn der intraabdominelle Druck akut um >20-25 mmHg ansteigt, es zu einer Endorganbeeinträchtigung kommt und nach chirurgischer Entlastungstherapie eine Besserung eintritt. [66] In einer vorausgegangenen Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass sich der subkapsuläre Druck 6 Stunden nach renaler Ischämie-Reperfusion im Mausmodell bis zum 7,6 fachen Wert erhöhte und signifikant erhöhte intrarenale Druckwerte auch bis 48 Stunden nach Ischämie-Reperfusion nachgewiesen werden konnten. Weiterhin wurde innerhalb der ersten zehn Minuten nach Inzisionstherapie ein deutliches Abfallen der intrarenalen Druckwerte beobachtet. [43] Betrachtet man nun das abdominelle Kompartiment-Syndrom beim Menschen, so zeigt sich, dass bei einem Großteil der Patienten sich erst ab intraabdominellen Druckwerten von 10-15 mmHg eine Verschlechterung der Mikrozirkulation einstellt und damit erst die Voraussetzung für den Beginn eines akuten Kompartiment-Syndroms geschaffen wird. [66] Die hier bei Mäusen gemessenen Druckwerte nach Ischämie-Reperfusion überstiegen allerdings Druckwerte von 8 mmHg nicht. Dies bedeutet hingegen nicht, dass bei diesen niedrigeren intrarenalen Druckwerten kein Kompartiment entstehen könnte, da weniger die absolute Höhe des Druckes in der Pathogenese des Kompartiment-Syndroms eine Rolle spielt als eher die Tatsache, wie lange das Gewebe diesem erhöhtem Druck ausgesetzt ist. [66] Hinzu kommt, dass hier Daten von Menschen mit denen von Mäusen verglichen werden und außerdem ein anderes Organsystem untersucht wurde. Weiterhin ist bekannt, dass sich hohe Druckwerte und Ischämie mit anschließender Reperfusion gegenseitig verstärken und so einen Circulus Vitiosus verursachen. Somit ist die Ischämie selbst als Risikofaktor für das Auftreten eines akuten Kompartiment-Syndroms anzusehen. [67] Dieses befindet sich im Einklang mit den hier gewonnen Ergebnissen, bei denen eine längere Ischämiezeit auch mit signifikant höheren subkapsulären Druckwerten vergesellschaftet war. Einen weiteren Faktor, der für Entstehung und Verstärkung eines Kompartiment-Syndroms verantwortlich zu sein scheint, liefert Harvey et.al. mit seiner Studie über das Kompartiment-Syndrom. Dort zeigte sich, dass leukopene Ratten in einem Modell, in dem ein künstliches Kompartiment-Syndrom in einem Muskelkompartiment generiert wurde, geringere Druckwerte und Gewebeschäden aufwiesen als Kontrolltiere. Daraus wurde geschlossen, dass Inflammation erheblich an der Entstehung eines akuten Kompartiment-Syndroms beteiligt zu sein scheint. [67] In Summation dieser Erkenntnisse lässt sich mutmaßen, dass nicht der erhöhte subkapsuläre Druck alleine, sondern ein komplexes Zusammenspiel

zwischen intrarenalem Druck, intrarenaler Perfusion, Ischämie, Reperfusion und Inflammation die gravierenden Gewebsschäden der Niere nach Ischämie-Reperfusion hervorrufen. In Analogie zu den bekannten Kompartment-Syndromen von Muskulatur und Abdomen erschien eine chirurgische Intervention zur Druckentlastung das Mittel der Wahl. [66] Es wurde sich daher in dieser Studie für eine sehr kleine rundliche Inzision am unteren Nierenpol entschieden, da längliche Inzisionen zu einem Aufreißen der Nierenkapsel, Protrusion von Nierenparenchym und Schäden an den Inzisionsrändern führten. Einen weiteren Vorteil scheint die zirkuläre Beschaffenheit der Inzision selbst zu erzeugen, indem eventuell die Oberflächenspannung der Nierenkapsel verringert wird, was wiederum eine intrarenale Druckreduktion zur Folge haben könnte. [43] Als interessanten Nebebefund der mit Mikrokapsulotomie therapierten Gruppen gilt es zu erwähnen, dass bei der szintigraphischen Nierenfunktionsbestimmung am 2. postoperativen Tag auch perirenal um die Inzisionsstelle herum Radioaktivität nachgewiesen werden konnten, was auf einen Abfluss von interstitieller Flüssigkeit als Mechanismus der Druckentlastung hinweist. [43] Ob es sich bei dieser Flüssigkeit allerdings um rein interstitielle Flüssigkeit oder auch Lymphe handelt und welche Zellen diese enthält, bedarf weiterer Abklärung. Weiterhin ist im Einzelnen noch nicht ausreichend untersucht, ob der Austritt interstitieller Flüssigkeit über die Mikroinzision für die allmähliche Druckreduktion verantwortlich ist und so eine renoprotektive Wirkung entfaltet.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch eine Therapie mit MSC und Mikrokapsulotomie die Gewebeschäden an der Niere nach Ischämie-Reperfusion deutlich vermindert werden konnten. Obwohl die Therapie mit MSC nicht mit einer signifikanten Verbesserung der Nierenfunktion nach Ischämie-Reperfusion einherging, könnte die verminderte Gewebeschädigung durch Mikrokapsulotomie/MSC-Therapie die Nierenfunktion bzw. im Transplantationssetting das Transplantatüberleben längerfristig erhalten. Der Nachweis solcher günstiger Effekte bedarf weiterer experimenteller und klinischer Studien. Weiterhin wecken Fortschritte in der Erforschung pluripotenter Stammzellen die Hoffnung, Erfolge bei der Behandlung bislang nicht therapierbare Erkrankungen erzielen zu können. Verschiedene Stammzelltherapien werden derzeit bereits im Rahmen von klinischen Studien am Menschen untersucht. Viele dieser Studien basieren auf einer Stammzelltherapie mit MSC [68]. Für welche Erkrankungen eine Therapie mit MSC sinnvoll ist und welches Therapieregime dabei angewendet werden sollte bedarf jedoch weiterer Grundlagenforschung und klinischer Studien. Auch in der Transplantationsmedizin gelten stammzellbasierte Therapien als vielversprechend, um das Transplantatüberleben zu verbessern. So werden aktuell im Rahmen einer Phase-1-Studie Patienten am Tag ihrer Lebertransplantation und drei Tage postoperativ intravenös MSC eines allogenen Spenders infundiert, um Immunsystem und die T-Zell-Proliferation zu unterdrücken. [69] Inwiefern die Applikation von MSC das Transplantatüberleben beim Menschen beeinflusst bzw. verlängert und welche Rolle die Mikrokapsulotomie in der humanen Anwendung spielt, ist in zukünftigen klinischen Studien zu klären.

7 Danksagung

Es gibt eine große Zahl an Menschen, die mich jahrelang bei der Umsetzung dieser Dissertation unterstützt haben und denen ich danken möchte.

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr.med. Karl-Walter-Jauch nennen, der mir diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr.med. Tanja Herrler und Anne Wagner die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir bei Problemen stets mit Rat und Tat über viele Jahre zur Seite standen.

Weiterhin möchte ich der Nuklearmedizinischen Abteilung und der Neurochirurgischen Forschungsabteilung des Klinikums Großhadern für die gute Zusammenarbeit danken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden bedanken, die mich mit Verständnis und Zuspruch begleitet haben und es mir ermöglicht haben, mich ganz auf Studium und Dissertation zu konzentrieren.

Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Meyer, Andreas Ulrich

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Stammzellen-vermittelte Nierenregeneration nach Nierentransplantation

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 30.11.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

1. Niere. 2011; Available from: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/archive/0/02/20070123184139!Gray1128.png>
2. Sutton, T.A., *Alteration of microvascular permeability in acute kidney injury*. Microvascular Research 2009. **77 (2009) 4–7**.
3. [cited 2011; Available from: <http://www.info-dialyse.de/transhistorie.php> (20.03.2011).
4. Berlin, C. http://transplantation-cbf.charite.de/patienten/transplantation/historie_der_transplantationsmedizin/. 2014; Available from: http://transplantation-cbf.charite.de/patienten/transplantation/historie_der_transplantationsmedizin/.
5. Bundestag, D., *Zwischenbericht der Enquete-Kommission Ethik und Recht der modernen Medizin Organlebenspende*. 2005.
6. Eurotransplant, <https://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=home> (Stand 05.11.2014). 2014.
7. David P. Basile, D.D., Kelly Roethe and Jeffrey L. Osborn, *Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function*. Am J Physiol Renal Physiol, 09.August 2001. **281:F887-F899, 2001**
8. Just, A., *Mechanisms of renal blood flow autoregulation: dynamics and contributions*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2007. **292:R1-R17, 2007**
9. Herold, G., *Innere Medizin Gerd Herold 2009* 2009: Gerd Herold Köln.
10. Eglė Dalinkevičienė¹, V.K., Kristina Petruilienė¹, Inga Skarupskienė¹, and I.A.B. Gintarė Bagdonavičiūtė², *Ten-year experience of kidney transplantation at the Hospital of Kaunas University of Medicine: demography, complications, graft and patient survival*. Medicina (Kaunas) 2010, 2010. **46(8):538-43**
11. Byung Joo Jeon, I.G.K., Youl Keun Seong, Bo Hyun Han Department of Urology, Maryknoll Hospital, Busan, Korea, *Analysis of the Results of ABO-Incompatible Kidney Transplantation: In Comparison with ABO-Compatible Kidney Transplantation*. Korean J Urol 2010; 2010. **51:863-869**
12. Hélène Francois , A.J., et al., *Emerging strategies to preserve renal function*. JNEPHROL 2011, 2011. **24(02): 133-141**.
13. John Dirks, G.R., Susan Horton, Arrigo Schieppati, and a.S.A.H. Rizvi, *Diseases of the Kidney and the Urinary System*. Chapter 36.
14. Eurotransplant, <http://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=Year+Statistics+2014.pdf>. 29.10.2015.

15. Kaplan, K.L.W.a.B., *Recent Developments in Kidney Transplantation – A Critical Assessment*. Am J Transplant. 2009 June 2009. **9(6): 1265–1271**
16. CY Cheung, H.C., YH Chan, KF Chau, CS Li, *Impact of delayed graft function on renal function and graft survival in deceased kidney transplantation*. Hong Kong Med, 2010. **J Vol 16 No 5**
17. Hamid Reza Khalkhali, E.H., Anoushirvan Kazemnejad,¹ Ali Ghafari², *Long-term Progression Pattern of Chronic Allograft Dysfunction Among Kidney Transplant Recipients*. Iranian Journal of Kidney Diseases 2010. **Volume 4 | Number 3 | July 2010**
18. Roberto Marcén¹, J.M.M., Ana Fernández-Rodríguez¹, Luis Capdevila³, Luis Pallardó⁴, J.J.C. Juan José Plaza⁵, Josep María Puig⁷, Ana Sanchez-Fructuoso⁸, Manuel Arias⁹, and G.A.a.D. Serón³, *Long-term graft function changes in kidney transplant recipients*. NDT Plus (2010), 2010. **3 [Suppl 2]: ii2–ii8**
19. Lynn D. Cornell, R.N.S.a.R.B.C., *Kidney Transplantation: Mechanisms of Rejection and Acceptance*. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2008, 2008. **3:189–220**
20. al., L.C.R.e., *The Banff 97 working classification of renal allograft pathology* Kidney International 1999. **Vol.55, 1999, p713-723**
21. Bleackley[‡], M.B.a.R.C., *CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES: ALL ROADS LEAD TO DEATH*. NATURE REVIEWS | IMMUNOLOGY 2002. **VOLUME 2 | JUNE 2002 | 401**
22. CHRISTIAN P LARSEN, P.M., AND JONATHAN M. AUSTYN, *MIGRATION OF DENDRITIC LEUKOCYTES FROM CARDIAC ALLOGRAFTS INTO HOST SPLEENS A Novel Pathway for Initiation of Rejection*. J. Exp. Med. © The Rockefeller University Press, 1990. **Volume 171 January 1990 307-314**.
23. P. Lipta' ka, E' . Keme' nya, Z. Morvayb, E. Szederk ' enyic, P. Szenohradszkyc, F. Marofkac, J. Toldid, M. Exnere and B. Iv ' anyia, *Peritubular Capillary Damage in Acute Humoral Rejection: An Ultrastructural Study on Human Renal Allografts*. American Journal of Transplantation 2005. **2005; 5: 2870–2876**
24. Mauiyyedi S, C.M., Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Tolckoff-Rubin NE, Williams WW, Delmonico FL, Cosimi AB, Colvin RB, *Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification*. J Am Soc Nephrol. , 2002. **2002 Mar;13(3):779-87**.

25. M. Wahrman, M.E., M. Schilling, B. Haidbauer, H. Regele, G. F. Ko"rmocid, W. H. Ho"rla and G. A. Bo"hmig, *Pivotal Role of Complement-Fixing HLA Alloantibodies in Presensitized Kidney Allograft Recipients*. American Journal of Transplantation, 2006. **2006; 6: 1033–1041**
26. Hirofumi Ota, 2 Karen Fox-Talbot,1 Weimin Hu,1,3 Zhiping Qian,1 Fred Sanfilippo,1,4 Ralph H. Hruban,1 and William M. Baldwin, *Terminal Complement Components Mediate Release of von Willebrand Factor and Adhesion of Platelets in Arteries of Allografts*. Transplantation 2005. **2005;79: 276–281**.
27. Colvin RB, N.V., *Renal transplant pathology*. In *Heptinstall's Pathology of the Kidney*, ed. J.O. JC Jennette, MM Schwartz, FG Silva. 2006, Philadelphia: Lippincott-Raven.
28. W. M. Janssen, H.B., R. de Bruin, P. E. de Jong and D. de Zeeuw, *Noninvasive measurement of intrarenal blood flow distribution: kinetic model of renal 123I-hippuran handling*. Am J Physiol Renal Physiol 1995. **269:F571-F580, 1995. ;**
29. Raj Munshi1, C.H., Jonathan Himmelfarb2, *Advances in understanding ischemic acute kidney injury*. BMC Medicine 2011, 2011. **9:11**.
30. Fine LG, O.C., Norman JT., *Progressive renal disease: the chronic hypoxia hypothesis*. Kidney Int Suppl. 1998, 1998. **Apr;65:S74-8**.
31. Liu, Y., *New Insights into Epithelial-Mesenchymal Transition in Kidney Fibrosis*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21: 212–222, 2010**
32. Steven G. Coca, D., Bushra Yusuf, MD, Michael G. Shlipak, MD, MPH, Amit X. Garg, MD, PhD, and Chirag R. Parikh, MD, PhD, *Long-term Risk of Mortality and Other Adverse Outcomes After Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-analysis*. Am J Kidney Dis., 2009. **2009 June ; 53(6): 961–973**.
33. Norman, L.G.F.a.J.T., *Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics*. Kidney International, 2008. **(2008) 74, 867–872**
34. Farbod Rastegar, D.S., Jiayi Huang, Wenli Zhang, Bing-Qiang Zhang, Bai-Cheng He, Liang Chen, Guo-Wei Zuo, Qing Luo, Qiong Shi, Eric R Wagner, Enyi Huang, Yanhong Gao, Jian-Li Gao, Stephanie H Kim, Jian-Zhong Zhou, Yang Bi, Yuxi Su, Gaohui Zhu, Jinyong Luo, Xiaoji Luo, Jiaqiang Qin, Russell R Reid, Hue H Luu, Rex C Haydon, Zhong-Liang Deng, Tong-Chuan He, *Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications*. World J Stem Cells, 2010. **2010 August 26; 2(4): 67-80**.
35. Karen Bieback, I.B., *Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy*. World J Stem Cells 2010. **2010 August 26; 2(4): 81-92**
36. Lindolfo da Silva Meirelles, P.C.C.a.N.B.N., *Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues*. Journal of Cell Science, 2006. **119, 2204-2213**

37. MARINA MORIGI, a.M.I., b BARBARA IMBERTI,a DANIELA CORNA,a MAURO ABBATE,a CINZIA ROTA,a DANIELA ROTTOLI,a ARIELA BENIGNI,a NORBERTO PERICO,a CARLA ZOJA,a ALESSANDRO RAMBALDI,b ANDREA REMUZZI,a GIUSEPPE REMUZZI, *Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Accelerate Recovery of Acute Renal Injury and Prolong Survival in Mice*. STEMCELLS, 2008. **2008;26:2075–2082**
38. Arianna Malgieri¹, E.K., Maria Patrizia Patrizi³, Stefano Gambardella^{1,4}, *Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art*. Int J Clin Exp Med 2010. **2010;3(4):248-269**.
39. Orit Kollet, S.S., 1 Yuan-Qing Chen,² Jenny Suriawinata,³ Swan N. Thung,³ Mariana D. Dabeva,² Joy Kahn,¹ Asaf Spiegel,¹ Ayelet Dar,¹ Sarit Samira,¹ Polina Goichberg,¹ Alexander Kalinkovich,¹ Fernando Arenzana-Seisdedos,^{3,4} Arnon Nagler,⁵ Izhar Hardan,⁵ Michel Revel,^{1,6} David A. Shafritz,² and Tsvee Lapidot¹, *HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver*. The Journal of Clinical Investigation 2003. **July 2003 | Volume 112 | Number 2**
40. Tracey L Bonfield^{1*}, M.T.N.K., Donald P Lennon², Arnold I Caplan², *Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo*. Journal of Inflammation 2010. **2010, 7:51**
41. Minoo Battiwalla, M., MSA and Peiman Hematti, MD, *Mesenchymal Stem Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Cytotherapy. 2009 2009. **11(5): 503–515**.
42. Matthias Schieker, et al., *Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence*. J. Anat. (2007) 210, pp592– 599, 2007.
43. Herrler, T., et al., *The intrinsic renal compartment syndrome: new perspectives in kidney transplantation*. Transplantation, 2010. **89(1): p. 40-6**.
44. Kötter, D.R. *Histologie der Harnorgane*. 1998.
45. Florian To'gel, 2 Zhuma Hu,¹ Kathleen Weiss,¹ Jorge Isaac,³ Claudia Lange,⁴ and Christof Westenfelder^{1,2}, *Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms*. Am J Physiol Renal Physiol 2005. **289: F31–F42, 2005**.
46. Stefano Gatti¹, Stefania Bruno^{2,3,*}, Maria Chiara Deregibus², Andrea Sordi¹, Vincenzo Cantaluppi², Ciro Tetta⁴ and Giovanni Camussi², *Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury*. Nephrol Dial Transplant 2011. **(2011) 26: 1474–1483**

47. Herrera MB, B.B., Bruno S, Fonsato V, Romanazzi GM, Camussi G., *Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury*. Int J Mol Med., 2004. **2004 Dec;14(6):1035-41**.
48. MARINA MORIGI, B.I., * CARLA ZOJA,* DANIELA CORNA,* SUSANNA TOMASONI,* MAURO ABBATE,* DANIELA ROTTOLI,* STEFANIA ANGIOLETTI,* ARIELA BENIGNI,* NORBERTO PERICO,* MALCOLM ALISON,† and GIUSEPPE REMUZZI*‡, *Mesenchymal Stem Cells Are Renotropic, Helping to Repair the Kidney and Improve Function in Acute Renal Failure*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15: 1794–1804, 2004**
49. Stefania Bruno, C.G., * Maria Chiara Deregibus,* Raffaele A. Calogero,† Silvia Saviozzi,‡ Federica Collino,* Laura Morando,* Alessandro Busca,‡ Michele Falda,‡ Benedetta Bussolati,* Ciro Tetta,§ and Giovanni Camussi*, *Mesenchymal Stem Cell-Derived Microvesicles Protect Against Acute Tubular Injury*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20: 1053–1067, 2009**
50. V Ninichuk¹, O.G., S Segerer¹, R Hoffmann³, E Radomska¹, A Buchstaller⁴, R Huss^{4,5}, N Akis⁶, D Schlo¹ndorff¹ and H-J Anders, *Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice*. Kidney International, 2006. **(2006) 70, 121–129**
51. Tanja Herrler^{1*}, H.W., Anne Tischer¹, Nina Schupp³, Sebastian Lehner², Andreas Meyer¹, Jens Wallmichrath¹, Antje Habicht³, Bechara Mfarrej³, Hans-Joachim Anders⁴, Peter Bartenstein², Karl-Walter Jauch¹, Marcus Hacker², Markus Guba¹, *Decompression of Inflammatory Edema along with Endothelial Cell Therapy Expedites Regeneration after Renal Ischemia-Reperfusion Injury*. Cell Transplantation, 2012.
52. Kinsey, G.R.S., R.; Huang, L.; Li, L.; Vergis, A. L.; Ye, H.; Ju, S. T.; Okusa, M. D., *Regulatory T-cells suppress innate immunity in kidney ischemia-reperfusion injury*. J. Am. Soc. Nephrol, 2009.
53. Baoyuan Bi, J.G., Arnaud Marlier, Shin Ru Lin, and Lloyd G. Cantley, *Erythropoietin expands a stromal cell population that can mediate renoprotection*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295: F1017–F1022, 2008**.
54. O'Donnell MP, B.M., Daniels F, Rabb H, *Utility and limitations of serum creatinine as a measure of renal function in experimental renal ischemia-reperfusion injury*. Transplantation, 2002. **2002 Jun 15;73(11):1841-4**.
55. Tanja Herrler¹, H.W., Anne Tischer¹, Peter Bartenstein², Karl-Walter Jauch¹, Markus Guba¹, Markus Diemling³, Cyril Nimmon⁴ and Marcus Hacker², *99mTc-MAG3 scintigraphy for the longitudinal follow-up of kidney function in a mouse model of renal ischemia-reperfusion injury*. EJNMMI Research, 2012. **2012, 2:2**

56. Fei Jiang, 2 Jie Ma,^{1,2} Yi Liang,^{1,2} Yuming Niu,³ Ning Chen,^{1,2} and Ming Shen¹, *Amniotic Mesenchymal Stem Cells Can Enhance Angiogenic Capacity via MMPs In Vitro and In Vivo*. 2015.
57. Thorsten Buch¹, F.L.H., Christine Tertilt¹, Tobias J A J Heinen¹, Marcel Kremer³, F Thomas Wunderlich¹, Steffen Jung⁴ & Ari Waisman, *A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration*. NATURE METHODS, 2005. **IVOL.2 NO.6 | JUNE 2005**.
58. Florian Tögel, 3 Ying Yang,¹ Ping Zhang,¹ Zhuma Hu,¹ and Christof Westenfelder^{1,2,3}, *Bioluminescence imaging to monitor the in vivo distribution of administered mesenchymal stem cells in acute kidney injury*. Am J Physiol Renal Physiol 2008. **295: F315–F321, 2008**.
59. Catalin Toma, W.R.W., Shivani Bowry, Abigail Schwartz, Flordeliza Villanueva, *Fate Of Culture-Expanded Mesenchymal Stem Cells in The Microvasculature In Vivo Observations of Cell Kinetics*. Circ. Res., 2009. **2009;104;398-402**
60. TJ Rabelink¹, D.W.a.E.d.K., *Peritubular endothelium: The Achilles heel of the kidney?* Kidney International, 2007. **(2007) 72, 926–930; doi:10.1038/sj.ki.5002414;**
61. Oliver JA, M.O., Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q., *The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells*. J Clin Invest, 2004. **2004 Sep;114(6):795-804**
62. Takayuki Asahara, T.M., Alison Sullivan, Marcy Silver, Rien van der Zee, Tong Li, Bernhard Witzenbichler, Gina Schatteman, Jeffrey M. Isner, *Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis*. SCIENCE 1997. **VOL. 275 z 14 FEBRUARY 1997**
63. Andreas Meyer, A.T., Stephan Huber, Peter Bartenstein, Karl-Walter Jauch, Marcus Hacker, Markus Guba, Joachim Andrassy, Tanja Herrler, *Cell-based therapies for renal ischemia-reperfusion injury: mesenchymal stem cells versus endothelial progenitor cells*. Congress of the German Society of Surgery, Munich, 2011. **May 2011. DOI: 10.3205/11dgch121.**
64. JAN-LUUK HILLEBRANDS, F.A.K., WOUTER D. VAN DIJK & JAN ROZING, *Bone marrow does not contribute substantially to endothelial-cell replacement in transplant arteriosclerosis*. NATURE MEDICINE 2002. **VOLUME 8 • NUMBER 3 • MARCH 2002**
65. DUK-HEE KANG, J.H., * MARILDA MAZZALI,* GEORGE F. SCHREINER,[†] and RICHARD J. JOHNSON, *Impaired Angiogenesis in the Remnant Kidney Model: II. Vascular Endothelial Growth Factor Administration Reduces Renal Fibrosis and Stabilizes Renal Function*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12: 1448–1457, 2001**

66. Theodossis S Papavramidis, A.D.M., 1 Ioannis Pliakos, Isaak Kesisoglou, and Nicki Papavramidou, *Abdominal compartment syndrome – Intra-abdominal hypertension: Defining, diagnosing, and managing*. J Emerg Trauma Shock, 2011. **2011 Apr-Jun; 4(2): 279–291**
67. Edward J Harvey MD MSc FRCSC1 David W. Sanders, M., MSc, FRCSC2 Michael S Shuler, MD3 Abdel-Rahman Lawandy, MD, FRCSC2 Ashley L Cole, MPH3 Saad M AlQahtani, MD1 Andrew H Schmidt, MD4, *What's New in Acute Compartment Syndrome?* Journal of Orthopaedic Trauma Publish Ahead of Print, 2012. **DOI: 10.1097/BOT.0b013e31826df980.**
68. Buzhor, E., *Cell-based therapy approaches: the hope for incurable diseases*. Regen Med. 2014 Sep;9(5):649-672, 2014.
69. Nicola, S.-S., *Ziel ist eine längere Transplantatfunktion*. Deutsches Ärzteblatt, 2012. **Jg.109 Heft 35-36, Seite C1405-C1406, 3.September 2012.**